

Über die Denaturierung von Lactatdehydrogenase durch Dodecylsulfat

von

Hans-Michael Eichhorn

aus

München

1073 296

Aus dem Institut für Physikalische und Medizinische Strahlenkunde
der Universität Erlangen-Nürnberg

Direktor: Prof. Dr. med., Dr. phil. nat. H. Pauly

Über die Denaturierung von Lactatdehydrogenase durch Dodecylsulfat

Inaugural-Dissertation

zur Erlangung der Doktorwürde
der Hohen Medizinischen Fakultät
der Friedrich-Alexander-Universität
Erlangen-Nürnberg

vorgelegt

von

Hans-Michael Eichhorn

aus

München

Gedruckt mit Erlaubnis der Medizinischen
Fakultät der Universität Erlangen-Nürnberg



Dekan: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Referent: Prof. Dr. Dr. H. Pauly

Tag der mündlichen Prüfung: 9. Juli 1973

Meinen Eltern

1. Einleitung	1
2. Kindheit und Jugend	2
3. Studienjahre	3
4. Beruf und Familie	4
5. Reisen und Auslandsaufenthalte	5
6. Politische und literarische Betätigung	6
7. Die letzten Jahre	7
8. Nachwort	8
9. Literaturverzeichnis	9
10. Register	10
11. Anhang	11
12. Bibliographie	12
13. Literaturverzeichnis	13
14. Register	14
15. Anhang	15
16. Bibliographie	16
17. Literaturverzeichnis	17
18. Register	18
19. Anhang	19
20. Bibliographie	20
21. Literaturverzeichnis	21
22. Register	22
23. Anhang	23
24. Bibliographie	24
25. Literaturverzeichnis	25
26. Register	26
27. Anhang	27
28. Bibliographie	28
29. Literaturverzeichnis	29
30. Register	30
31. Anhang	31
32. Bibliographie	32
33. Literaturverzeichnis	33
34. Register	34
35. Anhang	35
36. Bibliographie	36
37. Literaturverzeichnis	37
38. Register	38
39. Anhang	39
40. Bibliographie	40
41. Literaturverzeichnis	41
42. Register	42
43. Anhang	43
44. Bibliographie	44
45. Literaturverzeichnis	45
46. Register	46
47. Anhang	47
48. Bibliographie	48
49. Literaturverzeichnis	49
50. Register	50
51. Anhang	51
52. Bibliographie	52
53. Literaturverzeichnis	53
54. Register	54
55. Anhang	55
56. Bibliographie	56
57. Literaturverzeichnis	57
58. Register	58
59. Anhang	59
60. Bibliographie	60
61. Literaturverzeichnis	61
62. Register	62
63. Anhang	63
64. Bibliographie	64
65. Literaturverzeichnis	65
66. Register	66
67. Anhang	67
68. Bibliographie	68
69. Literaturverzeichnis	69
70. Register	70
71. Anhang	71
72. Bibliographie	72
73. Literaturverzeichnis	73
74. Register	74
75. Anhang	75
76. Bibliographie	76
77. Literaturverzeichnis	77
78. Register	78
79. Anhang	79
80. Bibliographie	80
81. Literaturverzeichnis	81
82. Register	82
83. Anhang	83
84. Bibliographie	84
85. Literaturverzeichnis	85
86. Register	86
87. Anhang	87
88. Bibliographie	88
89. Literaturverzeichnis	89
90. Register	90
91. Anhang	91
92. Bibliographie	92
93. Literaturverzeichnis	93
94. Register	94
95. Anhang	95
96. Bibliographie	96
97. Literaturverzeichnis	97
98. Register	98
99. Anhang	99
100. Bibliographie	100
101. Literaturverzeichnis	101
102. Register	102
103. Anhang	103
104. Bibliographie	104
105. Literaturverzeichnis	105
106. Register	106
107. Anhang	107
108. Bibliographie	108
109. Literaturverzeichnis	109
110. Register	110
111. Anhang	111
112. Bibliographie	112
113. Literaturverzeichnis	113
114. Register	114
115. Anhang	115
116. Bibliographie	116
117. Literaturverzeichnis	117
118. Register	118
119. Anhang	119
120. Bibliographie	120
121. Literaturverzeichnis	121
122. Register	122
123. Anhang	123
124. Bibliographie	124
125. Literaturverzeichnis	125
126. Register	126
127. Anhang	127
128. Bibliographie	128
129. Literaturverzeichnis	129
130. Register	130
131. Anhang	131
132. Bibliographie	132
133. Literaturverzeichnis	133
134. Register	134
135. Anhang	135
136. Bibliographie	136
137. Literaturverzeichnis	137
138. Register	138
139. Anhang	139
140. Bibliographie	140
141. Literaturverzeichnis	141
142. Register	142
143. Anhang	143
144. Bibliographie	144
145. Literaturverzeichnis	145
146. Register	146
147. Anhang	147
148. Bibliographie	148
149. Literaturverzeichnis	149
150. Register	150
151. Anhang	151
152. Bibliographie	152
153. Literaturverzeichnis	153
154. Register	154
155. Anhang	155
156. Bibliographie	156
157. Literaturverzeichnis	157
158. Register	158
159. Anhang	159
160. Bibliographie	160
161. Literaturverzeichnis	161
162. Register	162
163. Anhang	163
164. Bibliographie	164
165. Literaturverzeichnis	165
166. Register	166
167. Anhang	167
168. Bibliographie	168
169. Literaturverzeichnis	169
170. Register	170
171. Anhang	171
172. Bibliographie	172
173. Literaturverzeichnis	173
174. Register	174
175. Anhang	175
176. Bibliographie	176
177. Literaturverzeichnis	177
178. Register	178
179. Anhang	179
180. Bibliographie	180
181. Literaturverzeichnis	181
182. Register	182
183. Anhang	183
184. Bibliographie	184
185. Literaturverzeichnis	185
186. Register	186
187. Anhang	187
188. Bibliographie	188
189. Literaturverzeichnis	189
190. Register	190
191. Anhang	191
192. Bibliographie	192
193. Literaturverzeichnis	193
194. Register	194
195. Anhang	195
196. Bibliographie	196
197. Literaturverzeichnis	197
198. Register	198
199. Anhang	199
200. Bibliographie	200
201. Literaturverzeichnis	201
202. Register	202
203. Anhang	203
204. Bibliographie	204
205. Literaturverzeichnis	205
206. Register	206
207. Anhang	207
208. Bibliographie	208
209. Literaturverzeichnis	209
210. Register	210
211. Anhang	211
212. Bibliographie	212
213. Literaturverzeichnis	213
214. Register	214
215. Anhang	215
216. Bibliographie	216
217. Literaturverzeichnis	217
218. Register	218
219. Anhang	219
220. Bibliographie	220
221. Literaturverzeichnis	221
222. Register	222
223. Anhang	223
224. Bibliographie	224
225. Literaturverzeichnis	225
226. Register	226
227. Anhang	227
228. Bibliographie	228
229. Literaturverzeichnis	229
230. Register	230
231. Anhang	231
232. Bibliographie	232
233. Literaturverzeichnis	233
234. Register	234
235. Anhang	235
236. Bibliographie	236
237. Literaturverzeichnis	237
238. Register	238
239. Anhang	239
240. Bibliographie	240
241. Literaturverzeichnis	241
242. Register	242
243. Anhang	243
244. Bibliographie	244
245. Literaturverzeichnis	245
246. Register	246
247. Anhang	247
248. Bibliographie	248
249. Literaturverzeichnis	249
250. Register	250
251. Anhang	251
252. Bibliographie	252
253. Literaturverzeichnis	253
254. Register	254
255. Anhang	255
256. Bibliographie	256
257. Literaturverzeichnis	257
258. Register	258
259. Anhang	259
260. Bibliographie	260
261. Literaturverzeichnis	261
262. Register	262
263. Anhang	263
264. Bibliographie	264
265. Literaturverzeichnis	265
266. Register	266
267. Anhang	267
268. Bibliographie	268
269. Literaturverzeichnis	269
270. Register	270
271. Anhang	271
272. Bibliographie	272
273. Literaturverzeichnis	273
274. Register	274
275. Anhang	275
276. Bibliographie	276
277. Literaturverzeichnis	277
278. Register	278
279. Anhang	279
280. Bibliographie	280
281. Literaturverzeichnis	281
282. Register	282
283. Anhang	283
284. Bibliographie	284
285. Literaturverzeichnis	285
286. Register	286
287. Anhang	287
288. Bibliographie	288
289. Literaturverzeichnis	289
290. Register	290
291. Anhang	291
292. Bibliographie	292
293. Literaturverzeichnis	293
294. Register	294
295. Anhang	295
296. Bibliographie	296
297. Literaturverzeichnis	297
298. Register	298
299. Anhang	299
300. Bibliographie	300
301. Literaturverzeichnis	301
302. Register	302
303. Anhang	303
304. Bibliographie	304
305. Literaturverzeichnis	305
306. Register	306
307. Anhang	307
308. Bibliographie	308
309. Literaturverzeichnis	309
310. Register	310
311. Anhang	311
312. Bibliographie	312
313. Literaturverzeichnis	313
314. Register	314
315. Anhang	315
316. Bibliographie	316
317. Literaturverzeichnis	317
318. Register	318
319. Anhang	319
320. Bibliographie	320
321. Literaturverzeichnis	321
322. Register	322
323. Anhang	323
324. Bibliographie	324
325. Literaturverzeichnis	325
326. Register	326
327. Anhang	327
328. Bibliographie	328
329. Literaturverzeichnis	329
330. Register	330
331. Anhang	331
332. Bibliographie	332
333. Literaturverzeichnis	333
334. Register	334
335. Anhang	335
336. Bibliographie	336
337. Literaturverzeichnis	337
338. Register	338
339. Anhang	339
340. Bibliographie	340
341. Literaturverzeichnis	341
342. Register	342
343. Anhang	343
344. Bibliographie	344
345. Literaturverzeichnis	345
346. Register	346
347. Anhang	347
348. Bibliographie	348
349. Literaturverzeichnis	349
350. Register	350
351. Anhang	351
352. Bibliographie	352
353. Literaturverzeichnis	353
354. Register	354
355. Anhang	355
356. Bibliographie	356
357. Literaturverzeichnis	357
358. Register	358
359. Anhang	359
360. Bibliographie	360
361. Literaturverzeichnis	361
362. Register	362
363. Anhang	363
364. Bibliographie	364
365. Literaturverzeichnis	365
366. Register	366
367. Anhang	367
368. Bibliographie	368
369. Literaturverzeichnis	369
370. Register	370
371. Anhang	371
372. Bibliographie	372
373. Literaturverzeichnis	373
374. Register	374
375. Anhang	375
376. Bibliographie	376
377. Literaturverzeichnis	377
378. Register	378
379. Anhang	379
380. Bibliographie	380
381. Literaturverzeichnis	381
382. Register	382
383. Anhang	383
384. Bibliographie	384
385. Literaturverzeichnis	385
386. Register	386
387. Anhang	387
388. Bibliographie	388
389. Literaturverzeichnis	389
390. Register	390
391. Anhang	391
392. Bibliographie	392
393. Literaturverzeichnis	393
394. Register	394
395. Anhang	395
396. Bibliographie	396
397. Literaturverzeichnis	397
398. Register	398
399. Anhang	399
400. Bibliographie	400
401. Literaturverzeichnis	401
402. Register	402
403. Anhang	403
404. Bibliographie	404
405. Literaturverzeichnis	405
406. Register	406
407. Anhang	407
408. Bibliographie	408
409. Literaturverzeichnis	409
410. Register	410
411. Anhang	411
412. Bibliographie	412
413. Literaturverzeichnis	413
414. Register	414
415. Anhang	415
416. Bibliographie	416
417. Literaturverzeichnis	417
418. Register	418
419. Anhang	419
420. Bibliographie	420
421. Literaturverzeichnis	421
422. Register	422
423. Anhang	423
424. Bibliographie	424
425. Literaturverzeichnis	425
426. Register	426
427. Anhang	427
428. Bibliographie	428
429. Literaturverzeichnis	429
430. Register	430
431. Anhang	431
432. Bibliographie	432
433. Literaturverzeichnis	433
434. Register	434
435. Anhang	435
436. Bibliographie	436
437. Literaturverzeichnis	437
438. Register	438
439. Anhang	439
440. Bibliographie	440
441. Literaturverzeichnis	441
442. Register	442
443. Anhang	443
444. Bibliographie	444
445. Literaturverzeichnis	445
446. Register	446
447. Anhang	447
448. Bibliographie	448
449. Literaturverzeichnis	449
450. Register	450
451. Anhang	

Inhaltsübersicht

	Seite
1. Einleitung und Problemstellung	1
2. Experimenteller Teil	4
2.1. Materialien und Geräte	4
2.1.1. Materialien	4
2.1.2. Geräte	5
2.2. Methoden	6
2.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration	6
2.2.2. Aktivitätsmessung	6
2.2.2.1. Prinzip	6
2.2.2.2. Ausführung	7
2.2.2.2.1. Ansatz	7
2.2.2.2.2. Aufzeichnung	7
2.2.2.2.3. Berechnung	8
2.2.3. Spektralphotometrische Untersuchungen	8
2.2.4. Bestimmung der SH-Gruppen	9
2.2.4.1. Prinzip	9
2.2.4.2. Ausführung	10
2.2.5. Gelchromatographie	11
2.2.5.1. Gelherstellung	11
2.2.5.2. Vorbereitung der Chromatographiesäulen	11
2.2.5.3. Entsalzen	11
2.2.5.4. Trennung der denaturierten LDH	12
2.2.5.4.1. Aufbau und Betrieb der Säule	12
2.2.5.4.2. Bereitung der Probe	13
2.2.5.4.3. Auswertung	14
2.2.5.4.4. Eichung der Säule	14
2.2.6. Analytische Ultrazentrifuge	15
3. Ergebnisse	16
3.1. Löslichkeit von Dodecylsulfat; Pufferwahl	16
3.2. Verlust der Enzymaktivität	17
3.3. Spektralphotometrische Untersuchungen	18
3.3.1. UV-Spektrum nativen LDH	18
3.3.2. UV-Differenzspektrum	20
3.3.3. Zeitliche Abnahme der Extinktion	23
3.4. Bestimmung der freien SH-Gruppen	24
3.5. Analytische Ultrazentrifuge	28
3.6. Gelchromatographie	30
3.6.1. Auftrennung der denaturierten LDH	30
3.6.2. Bestimmung des Molekulargewichtes	34
4. Diskussion	39
5. Zusammenfassung	47
6. Literatur	48

1. Einleitung und Problemstellung

Aus den letzten Jahren gibt es eine Vielzahl von Arbeiten, bei denen die Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf Lösungen von biologisch interessanten Makromolekülen untersucht wird. Man hofft, anhand dieser relativ einfachen Modellsysteme neue Erkenntnisse für die gesamte Strahlenbiologie zu gewinnen. Enzyme eignen sich für derartige Untersuchungen besonders gut, da man die Abnahme der biologischen Funktionsfähigkeit mit der Dosis leicht messen kann. Gleichzeitig ist es auch möglich, die durch die Bestrahlung verursachten Strukturveränderungen festzustellen. Von großem Interesse ist es dabei, ähnliche Denaturierungsprozesse des Enzyms kennen zu lernen, die durch andere Mittel z.B. durch chemische Agentien ausgelöst werden. Durch den Vergleich dieser Untersuchungen wird sich eine mögliche Korrelation zwischen Strukturveränderung und Aktivitätsverlust ergeben können.

Bei der Einwirkung von ionisierenden Strahlen auf Enzymlösungen wurden gleichzeitig mit der Inaktivierung eine Vergrößerung der Moleküle beobachtet, die sowohl durch Entfaltung als auch durch Aggregation bedingt sein kann. Dabei ist es in den meisten Fällen schwierig, zwischen diesen Möglichkeiten zu unterscheiden.

Entfaltung von Proteinmolekülen kann man ebenfalls durch die Einwirkung von Detergentien erreichen. Daraus ergibt sich eine Möglichkeit, die biologischen und physikalisch-chemischen Eigenschaften von Proteinen, die ihre ursprünglich globuläre Struktur durch Bruch der nicht kovalenten Bindungen verloren haben, zu untersuchen. Die hierbei gewonnenen Kenntnisse können zu

einem besseren Verständnis der molekularen Veränderungen durch Bestrahlung beitragen.

Ein weiterer Aspekt läßt die Untersuchung der Einwirkung von Detergentien auf Proteine im Hinblick auf die Strahlenbiochemie interessant erscheinen. Es war bis jetzt noch nicht möglich, die Art der Bindungen in den nach Bestrahlung auftretenden Aggregaten festzulegen. Auch hier besteht die Möglichkeit durch Einwirkung dieser Reagentien, die bekanntlich die schwachen Bindungen aufheben, zur Klärung dieser Frage beizutragen.

Da sich bereits mehrere Arbeiten (1-3) mit der Strukturveränderung der Lactatdehydrogenase bei Bestrahlung beschäftigen, wurde die vorliegende Untersuchung über die Denaturierung durch Detergenzien ebenfalls an diesem Enzym durchgeführt. Die Lactatdehydrogenase ist ein Enzym der Glykolyse und katalysiert die Reduktion der Brenztraubensäure zu Milchsäure. Ihre Quartärstruktur ist bestimmt durch die Zusammensetzung aus 4 Untereinheiten, die in 2 verschiedenen Formen auftreten. Kombinationen der Untereinheiten ergeben 5 mögliche Isoenzyme oder "Isozyme" (26); so besteht z.B. LDH-1 aus 4 B-Ketten, es wird auch LDH-H₄ genannt, da dieser Enzymtyp hauptsächlich im Herzmuskel vorkommt. Weiterhin gibt es LDH-2 (A₁B₃), LDH-3 (A₂B₂), LDH-4 (A₃B₁) und LDH-5 (A₄), das auch mit M₄ bezeichnet wird, da es im Skelettmuskel überwiegt. Das letzt genannte Enzym wurde in dieser Arbeit untersucht. Das Molekulargewicht aller Tetrameren wird mit 142 000 angegeben (21). Genauere Angaben über die Konformation der einzelnen Polypeptidketten (Monomere) werden von Röntgenstrukturanalysen am Proteinkristall berichtet (4). Die bis auf einen kurzen Rest globuläre Untereinheit besteht danach zu einem Vier-

tel aus α -Helices und zu 10 bis 15 % aus β -Strukturen ("pleated sheet", "pleated ribbon"). Die genaue Sequenz der Aminosäuren (Primärstruktur) kennt man noch nicht; jedoch ist bekannt, daß das Enzym keine Disulfidbrücken besitzt (37).

Als Detergenz wurde für diese Untersuchung Natriumdodecylsulfat gewählt. Detergenzien nehmen unter den bekannten denaturierenden Mitteln eine besondere Stellung ein, da sie schon in niedrigen Konzentrationen eine drastische Konformationsänderung auslösen, im Gegensatz z.B. zu Harnstoff, bei dem im Bereich von 6 bis 8 M gearbeitet wird. Über eine systematische Untersuchung der Konformationsänderung eines Proteins mit SDS wurde bisher noch nicht berichtet. Eine einzige, ältere Arbeit befaßt sich mit der Denaturierung von LDH (H_4 vom Rind und Huhn) durch Dodecylsulfat, aber im wesentlichen nur in Hinblick auf die Dissoziation des Tetramers (38). Vergleiche zwischen LDH-1 (H_4) und LDH-5 (M_4) sind jedoch nur bedingt möglich, da sich A- und B-Ketten durch einzelne Peptide unterscheiden (26) und Muskel-LDH im allgemeinen als weniger stabil gegen äußere Einflüsse gilt (6).

Bei der vorliegenden Arbeit war zunächst der zeitliche Ablauf der Reaktion von LDH mit SDS von Interesse; für mehrkettige Proteine, zu denen auch LDH gehört, finden sich in der Literatur Angaben von wenigen Minuten (38) bis zu mehreren Tagen (30). Weiterhin war es die Aufgabe die einzelnen Veränderungen am Enzymmolekül auszumachen, besonders deren Zusammenhang mit der Protein- und Detergenzkonzentration.

2. Experimenteller Teil

2.1. Materialien und Geräte

2.1.1. Materialien

Folgende Chemikalien und Materialien wurden verwendet:

- Lactatdehydrogenase¹⁾ aus Kaninchenmuskel in Kristallsuspension in 3,2 M Ammoniumsulfat
- Reduziertes Nikotinamid-adenin-dinucleotid²⁾ als di-Natriumsalz (80 %)
- Pyruvat, Natriumsalz; Böhringer und Söhne, Mannheim
- Sephadex G-25 und G-200
- Blue Dextran 2 000; Pharmacia, Uppsala
- Äthylendiamintetraacetat³⁾, di-Natriumsalz
- 5,5-Dithiobis-(2-nitrobenzoesäure⁴⁾)
- L-Glutathion, reduziert (98 %)
- Myoglobin vom Pferd
- Cytochrom c; Serva Entwicklungslabor, Heidelberg
- Rinderserumalbumin⁵⁾, trocken, "reinst"; Behringwerke AG Marburg
- Eialbumin; Fluka AG, chemische Fabrik Buchs SG
- Marinon; Henkel
- Hibitane; Imperial Chemical Industries
- Dodecylsulfat⁶⁾, Natriumsalz (zweimal in Äthanol umkristallisiert)

Sowie alle übrigen Chemikalien; Merck, Darmstadt.

Es wurde nur entmineralisiertes, zweimal quarzdestilliertes Wasser verwendet.

Abkürzungen: 1) LDH, 2) NADH, 3) EDTA,
 4) DTNB, 5) RSA, 6) SDS

2.1.2. Geräte

Folgende Geräte wurden benutzt:

- Spektralphotometer PMQ II;
- Transmissions-Extinktionswandler; Carl Zeiss, Oberkochen
- Quarz-Infrasil und -Suprasilküvetten, Schichtdicke 1 cm; Hellma, Müllheim
- Kompensations-Linienschreiber "Servogor"; Metrawatt, Nürnberg
- Mikropipetten Marburg; Eppendorf Gerätebau, Hamburg
- pH-Meter 27; Radiometer, Kopenhagen
- Elektrisches Magnetrührgerät JKA-Combimag; Janke und Kunkel, Staufen
- Durchflußphotometer LKB 8300 A Uvicord II mit 5 mm-Meßzelle
- Fallbügelschreiber LKB 6520-4, Einkanal-Punktschreiber
- Ultro Rac-Fraktionensammler LKB 7000; LKB-Produkter, Bromma, Schweden
- Colora Kühltruhe für Ultro Rac 7000; Colora Meßtechnik Lorch, Württemberg
- Chromatographierohre:
1,4 x 50 und 1,4 x 200 cm aus Plexiglas mit Kühlmantel, nach Plan angefertigt von Herrn Lehmeier, Institut für Physikalische und Medizinische Strahlkunde
- Einhängethermostat Thermomix II; B.Braun, Apparatebau Melsungen
- Analytische Ultrazentrifuge Spinco Modell E; Spinco Division, Beckman Instruments Inc., Belmont, Calif.

2.2. Methoden

2.2.1. Bestimmung der Proteinkonzentration

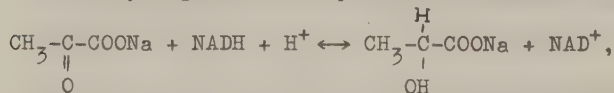
Der Messung und Berechnung des Proteingehaltes lag der Extinktionswert einer 0,1 %-igen Lösung von LDH-5 bei 280 nm nach JAENICKE zugrunde: $\epsilon = 1,44 \text{ ml/mg.cm}$ (21); das verwendete Präparat aus Kaninchenmuskeln besteht zu 95 % aus dem Isozym LDH-5 (21). 100 μl der unbekannten Proteinlösung wurden in 3 ml Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7,0) verdünnt. Die gesuchte Konzentration ergab sich aus dem gemessenen Extinktionswert E, dem ϵ_{280} , der Schichtdicke (1 cm) und dem Verdünnungsfaktor 31:

$$c_{\text{ges.}} = \frac{E \cdot 31}{1,44 \cdot 1} \frac{\text{mg}}{\text{ml}}$$

2.2.2. Aktivitätsmessung

2.2.2.1. Prinzip

Lactatdehydrogenase katalysiert die Reaktion



wobei das Gleichgewicht mehr auf der rechten Seite der Gleichung Pyruvat $\leftrightarrow$ Lactat liegt. Dabei wird pro Mol Pyruvat 1 Mol NADH_2 zu NADH dehydriert. Die Extinktion des Dihydropyridinsystems, die um 340 nm ein Maximum besitzt, verschwindet bei der Reaktion proportional der Abnahme an NADH_2 . Die Änderung der Extinktion pro Zeiteinheit ($\Delta E/\text{min}$) ist somit ein direktes Maß der Reaktionsgeschwindigkeit, bei hoher Substratkonzentration

ist sie proportional der Menge an aktivem Enzym. Bei geeigneter Enzymverdünnung verläuft $\Delta E/\text{min}$ linear.

2.2.2.2. Ausführung

2.2.2.2.1. Ansatz

Der Ansatz in der Meßkuvette (1 cm Schichtdicke) enthielt insgesamt 3,2 ml:

- 3,00 ml M/15 Natriumphosphatpuffer, pH 7,4
- 0,05 ml NADH_2 (7,1 mg/ml in 1 % NaHCO_3)
- 0,10 ml Enzymverdünnung

Mit 0,05 ml Pyruvat (8,6 mg/ml in H_2O) wurde die Reaktion gestartet. Sie verlief bei etwa 23°C ; ein Kontrollwert bei der jeweils gleichen Temperatur wurde mitgeführt. Die Lösungen des Coenzyms und des Substrats wurden nicht länger als eine Woche vor Benützung angesetzt (7).

2.2.2.2.2. Aufzeichnung

Ein Kompensationsschreiber wurde über einen Transmissions-Extinktions-Wandler (TEW) mit dem Ausgang des Photometers verbunden. Er registrierte die Extinktion in linearem Maßstab. Da bei schneller Reaktion die Kurve nicht mehr linear verlief, wurde an den steilsten Teil eine Tangente gelegt, auf die Zeit 1 min verlängert und der Wert für $\Delta E/\text{min}$ abgelesen. Die Schreibgeschwindigkeit betrug 600 oder 120 mm/min.

2.2.2.2.3. Berechnung

Die Enzymaktivität wurde in internationalen Einheiten (IU/ml) angegeben; 1 IU bedeutet 1 Mol Umsatz Substrat pro Minute bei 25°C. Außer der gemessenen Extinktionsänderung pro Minute, dem Testvolumen (3,2 ml) und dem Probevolumen (0,1 ml) gingen der molare Extinktionskoeffizient von NADH₂ bei 334 nm 6,0 cm²/μMol (7) und der Verdünnungsfaktor in die Gleichung ein. Da die Enzymkonzentrationen bei den einzelnen Versuchen unterschiedlich waren, diente als Vergleichsmaßstab die spezifische Aktivität: IU/ml dividiert durch die entsprechende Proteinkonzentration. Als 100 % Restaktivität, d.h. Aktivität des nativen Enzyms, wurde 580 IU/mg aus einer Eichkurve eingesetzt.

2.2.3. Spektralphotometrische Untersuchungen

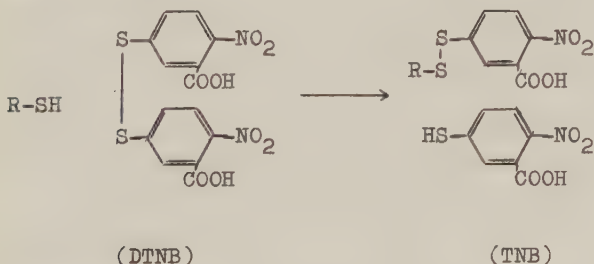
Für das Spektrum nativer LDH (1,2 mg/ml) diente 0,01 M Phosphatpuffer als Leerwert. Zur Aufnahme des Differenzspektrums wurde die Extinktion des nativen Enzyms gemessen gegen diejenige des denaturierten als Nullwert, bei gleichen Konzentrationen (1,56 mg/ml) in beiden Küvetten. Mit der gleichen Versuchsanordnung wurde die Extinktionsdifferenz ΔE bei 296 nm bis zu 20 Stunden verfolgt. Zur graphischen Darstellung wurden die Ergebnisse jedoch mit negativem Vorzeichen versehen, d.h. die Nulllinie wurde auf native LDH bezogen.

Um die absolute Extinktionsänderung innerhalb eines kürzeren Zeitraums erfassen zu können, wurde das Verfahren folgendermaßen geändert: Die Meßküvette wurde mit der LDH-Lösung (1,56 bzw. 0,78 mg/ml) vorbereitet. Gleichzeitig mit dem Einpipettieren der SDS-Verdünnung (in 0,5 ml) wurde die Zeit gemessen. Die Endkonzentration des Detergenz betrug 2 bzw. 1×10^{-3} M. Der Ausgangswert zur Zeit 0 ließ sich anhand einer Vergleichsküvette mit gleicher Enzymkonzentration, jedoch ohne Detergenz, festlegen. Die Extinktion von Dodecylsulfat bei 296 nm war bei den angegebenen Konzentrationen zu vernachlässigen. Alle Messungen wurden bei etwa 23°C durchgeführt.

2.2.4. Bestimmung der SH-Gruppen

2.2.4.1. Prinzip

Die Zahl der SH-Gruppen von SDS denaturierter LDH wurde nach der von ELLMANN (47) angegebenen Methode bestimmt. Dabei reagiert 5,5'-Dithiobis-2-nitro-benzoesäure (DTNB) mit den SH-Gruppen des Proteins nach der Gleichung:



Es entsteht pro Mol -SH 1 Mol Thionitrobenzoesäure (TNB), das eine gelbe Färbung zeigt. Der molare Extinktionskoeffizient ϵ des TNB bei 412 nm beträgt 15 500, die Absorption durch DTNB bei dieser Wellenlänge kann man vernachlässigen (17).

2.2.4.2. Ausführung

Das Enzym, 1,4 mg/ml, wurde mit der jeweiligen SDS-Menge bei Zimmertemperatur inkubiert. Der Ansatz in der Meßküvette bestand aus:

0,1 ml DTNB-Lösung (19,5 mM in 0,1 M Phosphatpuffer
pH 7,0)

0,5 ml inkubierte Enzymlösung mit 1 mM EDTA

2,5 ml Puffer der LDH-Lösung (0,01 M, pH 7,0) mit
1 mM EDTA

Äthylendiamintetraacetat (EDTA) wurde zugesetzt, um Schwermetallionen, die leicht mit SH-Gruppen reagieren, abzufangen. Die Konzentration des Disulfids in der Küvette ergab 0,63 mM. Die Messungen wurden bei Zimmertemperatur durchgeführt. Als Leerwert diente eine DTNB-Lösung gleicher Konzentration in Puffer mit EDTA. Die Zahl der SH-Gruppen pro LDH-Molekül ergab sich aus der gemessenen E_{412} , dividiert durch ϵ_{TNB} und die Molarität der Enzymlösung ($0,23 \text{ mg/ml} = 1,59 \times 10^{-6} \text{ M}$).

Um eine evtl. Beeinflussung der molaren Extinktion von TNB durch SDS zu klären, wurden die Werte einer Glutathionlösung mit und ohne Detergenz nach der Reaktion mit DTNB verglichen.

2.2.5. Gelchromatographie

2.2.5.1. Gelherstellung

Das trockene Gel (Sephadex G-25 und G-200) wurde in einer genügenden Menge destillierten Wassers verrührt. Nach Sedimentation wurde der Überstand mit sehr kleinen Gelpartikeln abgegossen und das Volumen mit Aqua dest. ergänzt. Anschließend wurde das Gel bei 120°C sterilisiert. Durch die hohe Temperatur und die Zeit bis zur Füllung der Chromatographiesäulen (mindestens 1 Tag) war eine vollständige Quellung des Gels gewährleistet.

2.2.5.2. Vorbereitung der Chromatographiesäulen

Die Säulen wurden vor jeder neuen Gelfüllung gereinigt, mit Marinon desinfiziert (mind. 2 Std.) und anschließend zweimal mit destilliertem, sterilen Wasser gespült. Um das Eindringen und das Wachstum evtl. vorhandener Mikroorganismen zu verhindern, erfolgte die Einfüllung der entgasten Gelsuspension und der Betrieb der Chromatographiesäulen unter möglichst sterilen Arbeitsbedingungen (Ausleuchten des Chromatographieraums mit UV-Licht, Sterilisation der Elutionspuffer, Desinfektion aller benützten Geräte mit 70 % Methanol oder Marinon. Das Gelbett wurde auf 4°C gekühlt. In den Benutzungspausen wurde mit 0,02 % Hibitane gespült. Genaue Arbeitsangaben, z.B. über das Füllen der Säulen, wurden den Büchern von DETERMANN (10) und FISCHER (15) entnommen.

2.2.5.3. Entsalzen

Das Protein wurde von dem hohen Salzgehalt des gelieferten Präparats (3,2 M Ammoniumsulfat) mit Sephadex G-25 auf der 1,4 x 50 cm Säule getrennt und in den zu

den Versuchen geeigneten Phosphatpuffer (0,01 M, pH 7,0) übergeführt. Die Probe bestand zu gleichen Teilen aus Kristallsuspension und Puffer, je nach Bedarf an Enzymlösung aus insgesamt 4,6 oder 10 ml. Nach dem Probenauftrag wurde das Gelbett mit einer Druckdifferenz von 1 m Wassersäule eluiert. 0,3 ml/min betrug die mittlere Durchflußgeschwindigkeit. Die größte Konzentration des Enzyms erschien etwa bei der 12. Fraktion (zu 3 ml = 45 Tropfen, E_{280} über 2). Das Ammoniumsulfat konnte ab Fraktion 15 mit NESSLERS Reagenz nachgewiesen werden.

2.2.5.4. Trennung der denaturierten LDH

2.2.5.4.1. Aufbau und Betrieb der Säule

Die Veränderungen des LDH-Moleküls wurden an einer Chromatographiesäule mit Sephadex G-200 untersucht. Das Gelbett war bis zu einer Höhe von 194 cm aufgefüllt. Vor dem Ein- und Auslauf verhinderte ein Perlonfilter auf einem Raster das Eindringen von Gelpartikeln in die Teflonschläuche (Durchmesser 1,2 mm). Der Durchfluß verlief von unten nach oben. Vom Pufferreservoir oder von der Probe zur Säule hatte die Leitung eine Länge von 135 cm, diejenige vom Ausfluß über die Meßzelle des Durchflußphotometers zum Fraktionssammler 250 cm. Der Flüssigkeitsspiegel des Elutionspuffers, der in der Sterilisationsflasche belassen wurde, wurde immer auf eine Höhe von 20 cm über dem Tropfauslauf eingestellt. Wegen des Druckverlustes in den Kapillarschläuchen dürfte der Arbeitsdruck dem einer Wassersäule von 10 % der Gelbettlänge gleichkommen, wie es für G-200 empfohlen wird (15). Um das Eindringen und die Vermehrung aerober Luftkeime möglichst gering zu halten, stand die Pufferflasche in Verbindung mit

einem Stickstoffbeutel mit atmosphärischem Druck. Auf das Prinzip der Mariotti-Flasche für einen konstanten Arbeitsdruck wurde verzichtet, um den Gasgehalt im Elutionspuffer möglichst gering zu halten und nicht unnötig Luft hindurchzuleiten. Die Aufbewahrung des Elutionsreservoirs bei Zimmertemperatur (25°C) hatte den Vorteil, daß sich relativ weniger N₂ löste als beim Durchfluß in der Säule (4°C).

Gemäß der Verringerung der Oberflächenspannung durch das Detergenz Dodecylsulfat veränderte sich mit der SDS-Konzentration das Volumen eines Tropfens und damit die Zahl der Tropfen pro Fraktion zu 3 ml:

SDS-Konzentration (mM)	Tropfenzahl
Phosphatpuffer /	45
0,5	60
1	70
2	75
3	85

Eine Erhöhung des Durchflusses mit SDS konnte nicht beobachtet werden. Er betrug im Mittel 4,2 ml/h bzw. 2,73 ml/h cm². Der Zeitbedarf eines Chromatographielaufes ergab sich aus der jeweiligen Position des Elutionspeaks, er reichte von 36 bis 78 Stunden. - Vor jedem Chromatographielauf mußte das Gelbett mit der entsprechenden Detergenzkonzentration equilibriert sein.

2.2.5.4.2. Bereitung der Probe

Vor der Chromatographie mit SDS wurden einige Proben von LDH und Eichproteinen (außer Myoglobin) nach einem für die Elektrophorese angegebenen Verfahren behan-

delt (43). Das Probevolumen von 10 ml mit etwa 1,5 bzw. 0,6 mg/ml Protein und der zu dem Versuch gehörenden SDS-Konzentration wurde mit 1 % Mercaptoäthanol 2 Stunden bei 37°C im Wasserbad inkubiert. Anderenfalls erfolgte der Probenauftrag bei Zimmertemperatur sofort nach der Mischung des Proteins im SDS-Puffer.

2.2.5.4.3. Auswertung

Die Transmission des Eluat (280 nm) wurde fortlaufend von einem Uvicord-Monitor verfolgt; je nach Proteinkonzentration der Probe wurde mit 1 oder 1 1/2-facher Skalenspreizung aufgezeichnet. Die gesammelten Fraktionen zu 3 ml wurden in der Kühltruhe bei +4°C bis zur Ausmessung nach Versuchsende aufbewahrt. Die Extinktion des Protein in den Fraktionen, die auf dem Schreiber einen Peak bildeten, wurde bei 280 nm gegen den entsprechenden Puffer bestimmt. In den Elutionsdiagrammen wurde die Position eines Peaks nach der Fraktionsnummer angegeben.

2.2.5.4.4. Eichung der Säule

Zur Bestimmung des Molekulargewichts von LDH nach Reaktion mit Dodecylsulfat diente der von ANDREWS (48) gefundene lineare Zusammenhang zwischen dem Elutionsvolumen globulärer Proteine und dem Logarithmus ihres Molekulargewichtes. Das Verfahren wurde nach WHITAKER (42) und FISH, REYNOLDS und TANFORD (14) modifiziert. Auf der Abszisse wurde anstelle des einfachen Elutionsvolumens V_e (entspricht der Fraktion mit der größten E_{280}) das reduzierte (relative) Elutionsvolumen V_e/V_0 angegeben. Die Applikation der Eichproteine erfolgte getrennt. Das Ausschlußvolumen V_0 wurde mit Blue-Dextran bestimmt.

2.2.6. Analytische Ultrazentrifuge ⁺)

Bei den ergänzenden Versuchen an der analytischen Ultrazentrifuge betrug die LDH-Konzentration 3 mg/ml, die SDS-Konzentration 2,14 und 4,15 x 10⁻³M.

Bei allen Sedimentationsgeschwindigkeitsläufen mit der Schlierenoptik wurde mit dem Rotor AN-D und 12 mm-Zellen (eine Normal- und eine Wedge-Zelle) gearbeitet. Die Rotationsgeschwindigkeit betrug 59.780 UpM, die Temperatur 20°C, der Schlierenwinkel 60°. Alle 8 min wurde ein Foto aufgenommen. Eine Verdünnungsreihe zur Extrapolation des S-Wertes auf die Proteinkonzentration 0 und eine Umrechnung auf Wasser als Lösungsmittel wurden nicht vorgenommen .

⁺) Die Versuche und deren Auswertung wurden dankenswerterweise von Herrn Reiß und Herrn Fey vom Physiologisch-Chemischen Institut durchgeführt.

3. Ergebnisse

3.1. Löslichkeit von Dodecylsulfat; Pufferwahl

Untersucht wurden Konzentrationen von Dodecylsulfat von $0,1$ bis 8×10^{-3} M in Natriumphosphatpuffern unterschiedlicher Molarität; Kaliumsalze eignen sich nicht, da Kaliumdodecylsulfat unlöslich ist (30). Bei Zimmertemperatur blieben alle verwendeten Lösungen ohne Niederschlag. Löslichkeit des freien SDS bei 4°C war jedoch Voraussetzung für die Arbeiten mit der Gelchromatographie (siehe 2.2.5.4.1.). Um eine evtl. Denaturierung des Enzyms zu verhindern, mußte eine möglichst hohe Salzkonzentration des Puffers gewählt werden. In $0,067$ M PO-Puffer, pH 7,2 (2,3) bildete sich bereits mit 1×10^{-4} M SDS ein kristalliner Niederschlag, in $0,05$ bis $0,02$ M Puffer erst bei einer SDS-Molarität von 2×10^{-3} . Da sich die zuletzt genannte Detergenzkonzentration als günstig erwies, wurden alle weiteren Versuche mit dem Enzym in $0,01$ M Natriumphosphatpuffer, pH 7,0, $I = 0,02$, durchgeführt, wobei SDS bis einschließlich 4 mM in Lösung blieb. Bei der Ionenstärke $I = 0,02$ würde die kritische Micellenkonzentration des SDS bei 4×10^{-3} M überschritten werden; darüber würden sich die SDS-Moleküle nicht mehr einzeln als Monomere in der Lösung befinden, sondern als Micellaraggregate. Diese binden sich nicht mehr an das Protein (33). Im neutralen pH-Bereich sind Veränderungen der LDH durch Aggregation und Dissoziation geringer als im sauren oder alkalischen pH-Bereich (18).

3.2. Verlust der Enzymaktivität

Die enzymatische Aktivität eines Proteins als seine spezifische Eigenschaft erweist sich gegenüber äußeren Einflüssen als sehr empfindlich; nach einer Denaturierung, wie z.B. hier mit dem Detergenz Dodecylsulfat, wäre zu allererst eine Zerstörung der Enzymaktivität zu erwarten.

Bis zu einer Stunde wurde Lactatdehydrogenase in SDS steigender Konzentration bei 25°C inkubiert. Der entsprechende Aktivitätsverlust war bereits eingetreten, bis die beiden Lösungen vermischt und eine Probe zur Aktivitätsmessung entnommen werden konnte. Dabei handelte es sich um einen Zeitraum unter 2 Minuten. Durch weitere Inkubation bis zu 60 min zeigte sich keine signifikante Änderung der erreichten Restaktivität mehr. Zum Vergleich blieb die Aktivität nativer LDH bei Erwärmung auf 25°C über eine Stunde unverändert.

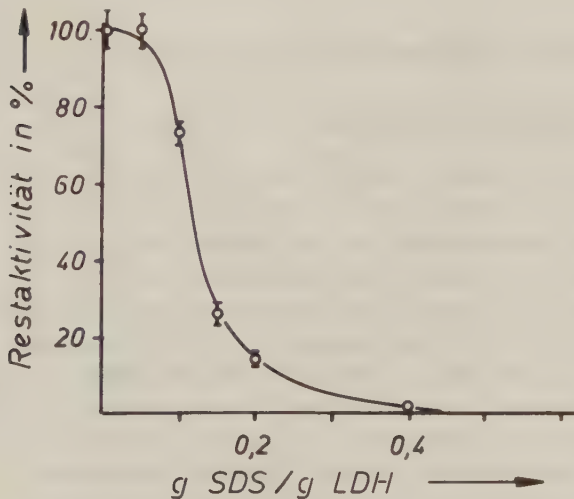


Abb.: 1 Restaktivität denaturierter LDH in Abhängigkeit des Verhältnisses SDS zu LDH beim Inkubieren. Enzymkonzentrationen: 1,29, 1,35, 1,42 mg/ml

Abb. 1 zeigt die verbliebene Aktivität von LDH in Prozenten derjenigen des nativen Enzyms in Abhängigkeit des zur Inkubation verwendeten Mengenverhältnisses von SDS zu LDH. Keine Beeinflussung der Aktivität konnte bei einem Verhältnis von 0,05 g SDS/g LDH nachgewiesen werden. Bei dem genannten Mengenverhältnis treffen auf ein LDH-Molekül bereits 25 SDS-Moleküle. Sehr steil fällt die Aktivität in dem Bereich von 0,05 bis etwa 0,2 g/g auf 14,2 % ab, zu höheren Quotienten hin wird die Kurve allmählich flacher; bei 0,4 g/g sind nur noch 2 % des Ausgangswertes zu finden. 50 % Restaktivität verbleiben etwa beim Verhältnis 1,25 g/g. Zerstört waren die enzymatischen Eigenschaften der LDH (< 2 %) bei den angegebenen Proteinkonzentrationen ab 2 mM Dodecylsulfat, d.h. etwa ab 0,41 bis 0,44 g/g. Für die weiteren Untersuchungen über die Veränderung des Enzyms wurde von dieser Konzentration bzw. diesem Verhältnis (0,4) ausgegangen.

3.3. Spektralphotometrische Untersuchungen

3.3.1. UV-Spektrum nativer LDH

Das charakteristische Spektrum der Proteine im UV-Bereich zwischen 250 und 310 nm entsteht durch die aromatischen Seitenketten von Tryptophan, Tyrosin und Phenylalanin. Das Maximum der Extinktion liegt bei 280 nm. Bei dem in Abb. 2 gezeigten Spektrum von LDH-5 (1,2 mg/ml in 0,01 M Phosphatpuffer) fällt besonders der asymmetrische Verlauf und die Schulter zwischen 288 und 290 nm auf. Eine Prüfung mit geringerer Extinktion und damit genauerer Ablesung am Photometer, ergab das gleiche Bild. In der Literatur konnte ein Vergleich nicht gefunden werden. Es wurde vermutet, diese Abweichung könnte durch eine vorzeitige Denaturation

turierung des Enzyms in dem niedermolaren Puffer bei der Entsalzung mit G-25 hervorgerufen werden. Derselbe Verlauf des Spektrums wurde jedoch auch mit einer Enzymlösung, die nicht von Ammoniumsulfat getrennt worden war, in 0,1 M Puffer bestätigt.

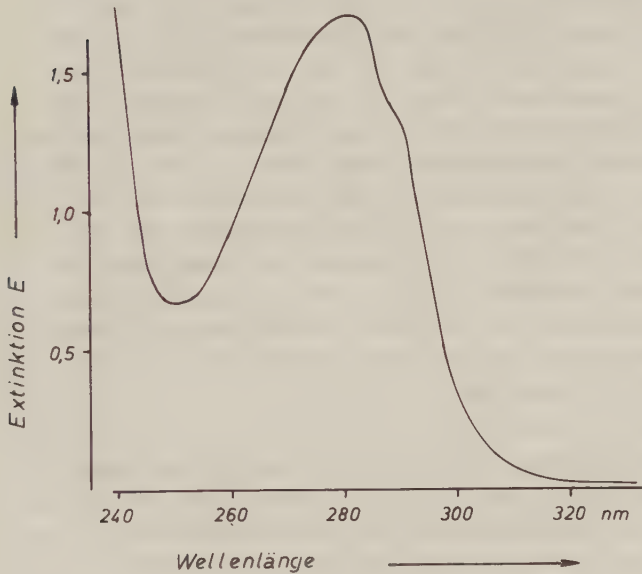


Abb.: 2 Spektrum nativer LDH-5

3.3.2. UV-Differenzspektrum

Die Denaturierung der Lactatdehydrogenase mit SDS führt zu der bereits gezeigten Zerstörung seiner enzymatischen Eigenschaften. Denaturierung bedeutet allgemein aber auch eine Änderung der Konformation eines Proteins (41). Diese bedingt eine Verschiebung seines Absorptionsspektrums im Bereich des ultravioletten Lichts (44). Die Entstehung des Spektrums der Proteine zwischen 250 und 310 nm ist in Abschnitt 3.3.1. beschrieben. Eine Änderung in diesem Bereich deutet auf Veränderungen in der Umgebung aromatischer, chromophorer Seitenketten eines Proteins hin (9). Das denaturierende Reagenz bzw. das Lösungsmittel beeinflussen in verschiedenem Ausmaß den Grund- und den angeregten Zustand der Elektronenhülle einer chromophoren Gruppe (SCHERAGA, 39). Da der Unterschied in der Extinktion eines denaturierten zu der eines nativen Proteins nur gering ist, wird direkt die Differenz zwischen beiden gemessen.

Die denaturierte LDH (0,37 g SDS/g LDH) zeigt im Differenzspektrum (Abb. 3) ein Minimum bei 296 nm. Gegenüber dem nativen Enzym ist der Rückgang der Extinktion bei dieser Wellenlänge am stärksten. Eine Abnahme der Absorption eines Proteins zwischen 270 und 300 nm bezeichnet man im allgemeinen als "denaturation blue shift" (25). Man versteht darunter die Verschiebung des Spektrums zu kürzeren Wellenlängen, hier verbunden mit einer Änderung der Intensität, der Extinktionsabnahme bei 296 nm (Abb. 4)

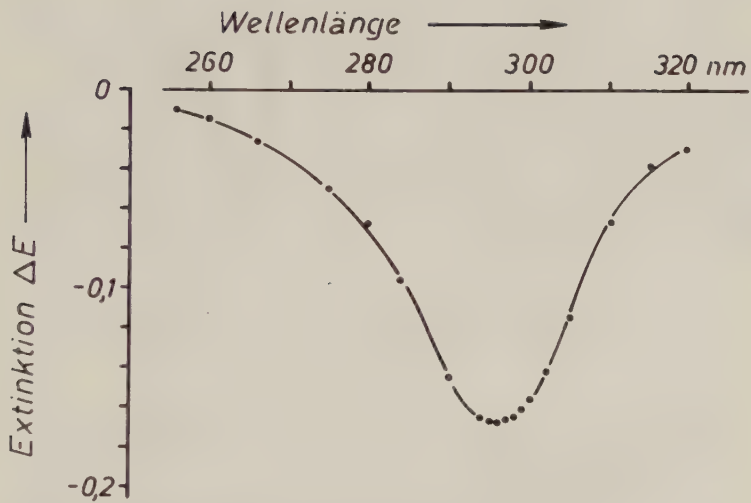


Abb.: 3 UV-Differenzspektrum denaturierter LDH($E_{\text{nat.}} = 0$)
LDH 1,56 mg/ml
SDS 2×10^{-3} M
 PO_4 -Puffer 0,01 M, pH 7,0

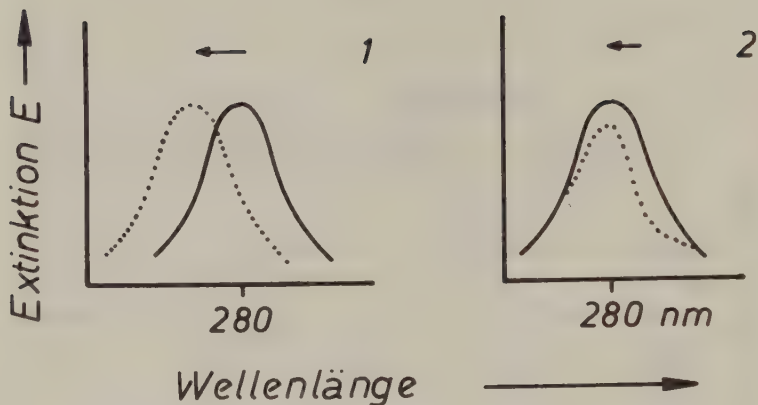


Abb.: 4 Zur Erklärung des "denaturation blue shift"
(siehe Text)
(schematisch)
1) Verschiebung des Spektrums ohne und
2) mit Intensitätsänderung (nach SCHERAGA)

Die Extinktionsdifferenz eines denaturierten Proteins bei 296 nm führen LIBOR et al. (bei basischem pH) auf eine phenolische Dissoziation der Tyrosinseitenketten zurück (25), während SCHERAGA (39) im Bereich von 295 nm Veränderungen am Indolringsystem des Tryptophans vermutet. Durch die Denaturierung werden die chromophoren Seitenketten, die teilweise oder gänzlich im Inneren des nativen Moleküls von anderen Seitenketten umgeben sind, für das Lösungsmittel zugänglich. Das hier gezeigte Differenzspektrum läßt darauf schließen, daß Dodecylsulfat zu einer zumindestens teilweisen Öffnung des gefalteten LDH-Moleküls führt.

3.3.3. Zeitliche Abnahme der Extinktion

Die Beobachtung des Differenzspektrums bis zu 20 Stunden erbrachte keine deutliche Abweichungen des ersten gemessenen Wertes nach 2 min. Durch eine schnelle Zugabe eines kleinen Volumens konzentrierter SDS-Lösung zum Protein gelang es, die Reaktion zwischen LDH und Detergenz photometrisch in einem Zeitraum unter 2 min zu verfolgen. Die Abnahme der Extinktion E_{296} durch Denaturierung (Abb. 5, Kurve 1). War bereits nach 5 sec eingetreten. Die dieser Veränderung des Enzyms zugrunde liegende Reaktion mit Dodecylsulfat war somit in dem sehr kurzen Zeitraum von maximal 5 sec abgelaufen.

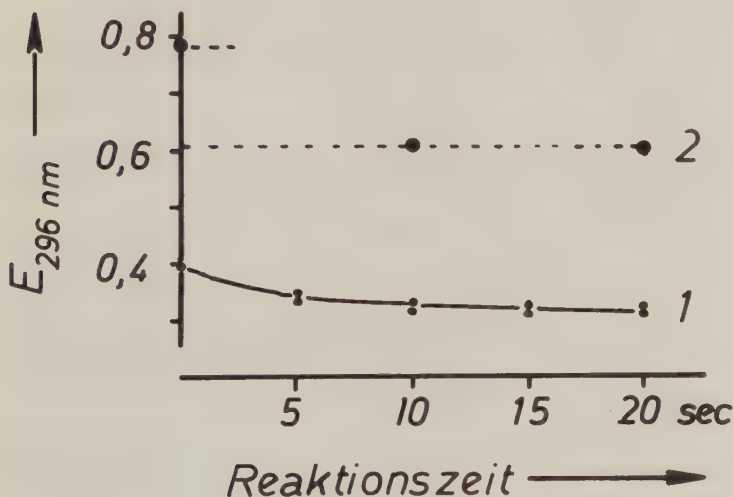


Abb.: 5 Abnahme der Extinktion E_{296} von LDH nach Zugabe von SDS

- 1) LDH: 0,78 mg/ml
SDS: 1 mM
Zum Vergleich:
- 2) LDH: 1,56 mg/ml
SDS: 2 mM

Ein Vergleich der Kurven 1 und 2 in Abb. 5 zeigt die gleiche relative Abnahme der Extinktion in beiden Fällen. In den Meßküvetten lag jeweils das gleiche Verhältnis von SDS zu LDH (0,37 g/g) vor. Die absoluten Konzentrationen unterschieden sich jedoch um den Faktor 2. Der Ablauf und das Ausmaß der Reaktion von LDH mit SDS hängen in dem verwendeten Konzentrationsbereich nicht von der einen oder anderen Konzentration ab, sondern nur von dem Mengenverhältnis der beiden Reaktionspartner.

3.4. Bestimmung der freien SH-Gruppen

Für LDH-5 wird ein Gesamtgehalt von 16 SH-Gruppen pro Molekül berichtet, der beim nativen Enzym nicht nachzuweisen ist (37). Wie die Entstehung des Differenzspektrums (siehe 3.3.2.) zeigt, führt die Denaturierung der LDH mit SDS zu Veränderungen im Inneren des Moleküls. Die im nativen Molekül eingeschlossenen Sulfhydrylgruppen könnten somit auch einem Nachweisreagenz (z.B. DTNB) zugänglich werden. Die Konzentration an Dithiobisnitrobenzoesäure bedingt sowohl die Reaktionsgeschwindigkeit mit den SH-Gruppen eines Proteins (22), als auch ab einer bestimmten Höhe dessen irreversible Denaturierung (49). Für die Untersuchungen mit LDH erwies sich eine DTNB-Konzentration von 0,63 mM in der Meßküvette als optimal (3).

Die Extinktion des TNB ($E_{412 \text{ nm}}$) stieg bei allen Versuchen mit der Reaktionszeit zwischen Enzym und DTNB an, bis sie nach etwa 30 bis 50 min einen Endwert erreichte. Abb. 6 zeigt als Beispiele den Verlauf von E_{412} bei einem SDS zu LDH Verhältnis von 0,2 und 0,4 g/g. Zur Umrechnung auf Mol SH pro Mol LDH wurde der Extinktionswert des Endplateaus eingesetzt.

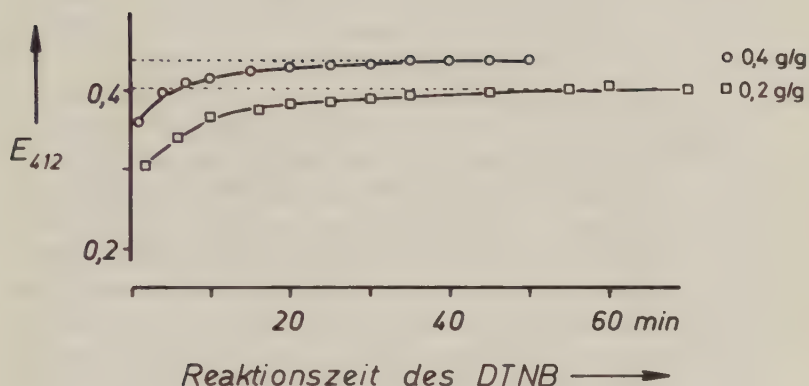


Abb.: 6 Zunahme der E_{412} mit der Reaktionszeit zwischen LDH und DTNB, als Beispiel 0,4 (oben) und 0,2 g SDS/g LDH (unten)

Der Extinktionskoeffizient des TNB ϵ_{TNB} wurde durch Dodecylsulfat nicht beeinflusst (vgl. auch 16,22); zwei Pufferlösungen mit Glutathion und DTNB, mit und ohne SDS ergaben keine Differenz der Extinktionen E_{412} . Dies ist Voraussetzung für einen befriedigenden Vergleich der SH-Gruppen nativer und mit steigender SDS-Konzentration inkubierter LDH.

Ab einem Verhältnis SDS zu LDH 0,15 g/g erbrachte eine Inkubation mit SDS keine Zunahme der reaktiven Sulfhydrylgruppen. Die erste Probenentnahme nach 1 min ergab bereits den beim jeweiligen Quotienten erreichten Endwert. Die SH-Werte für 0,05 und 0,1 g/g in Abb. 7 er-

gaben sich nach 30 Minuten Inkubation in SDS. Beim erstgenannten Verhältnis wurde nach 6 h eine Zunahme gegenüber 1 min um 4,15, beim zweiten um 0,8 Mol SH/Mol LDH beobachtet.

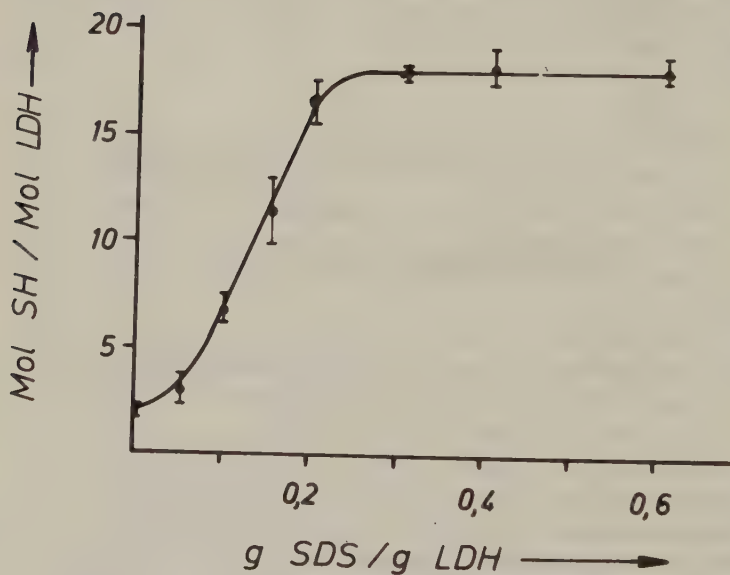


Abb.: 7 Zunahme der reaktiven SH-Gruppen mit dem Verhältnis SDS/LDH.
(0,05 und 0,1 g/g nach 30 min Inkubation)

Bis etwa 0,2 g/g nahm die Zahl der mit DTNB reagierenden Sulfhydrylgruppen signifikant zu (Abb. 7). Maximal ließen sich im Mittel 18 SH-Gruppen pro LDH-Molekül (Molekulargewicht 142 000) nachweisen. 16,7 Mol SH/Mol LDH werden nach Titration mit p-Chlormercuribenzoat (p-CMB) berichtet (38), bezogen auf ein Molekulargewicht 135 000 und einen Extinktionskoeffizienten ϵ für eine 0,1 %ige LDH-Lösung von 1,48. Eine Umrechnung auf 142 000 als Molekulargewicht und $\epsilon = 1,44$ (21) ergibt 17,1 SH/LDH. Die Zahlen der mit p-CMB und DTNB titrierbaren gesamten SH-Gruppen (17,1 und 18) stimmen gut überein. Der den Ergebnissen in Abb. 7 zu Grunde liegende, kürzlich berichtete Wert für den Extinktionskoeffizienten ϵ des TNB (17, 1970) ist somit dem noch vielfach zitierten (kleineren) Wert nach ELLMANN (47) vorzuziehen. Eine weitere Zunahme von freien SH-Gruppen mit höherem SDS-zu-LDH-Quotienten ist auch nach Analysen der Aminosäurezusammensetzung (2) nicht mehr zu erwarten. LDH besitzt keine Disulfidbrücken (37).

Das relativ "sperrige" DTNB-Molekül benötigt einen gewissen Raum in der Nähe einer SH-Gruppe, um mit ihr im Disulfidaustausch reagieren zu können. Das ist nur möglich, wenn sich die Cysteinseitenketten in der Nähe der Oberfläche des Proteinmoleküls befindet (22). Der Anstieg der reaktionsfähigen SH-Gruppen der LDH führt zu dem Schluß, daß die Denaturierung mit Dodecylsulfat diese Gruppen freilegt, sozusagen die Oberfläche des Proteinmoleküls vergrößert.

3.5. Analytische Ultrazentrifuge

Experimente an der analytischen Ultrazentrifuge liefern Informationen über

- die Masse und
- den Reibungswiderstand der sedimentierenden Teilchen. Aus der Masse erhält man Aussagen über das Molekulargewicht der sedimentierenden Moleküle; der Reibungswiderstand ist abhängig von ihrer Größe und Form. Aus Sedimentationsmessungen allein können sie aber nicht absolut bestimmt werden. Beim Sedimentationsgeschwindigkeitslauf sind die Drehzahlen der Zentrifuge so hoch, daß die Sedimentationskräfte die Diffusionskräfte überwiegen. Der gewonnene Sedimentationskoeffizient ist ein Maß dafür, wie schnell das durch ihn charakterisierte Teilchen im angelegten Zentrifugalbeschleunigungsfeld sedimentiert.

Die Resultate der Läufe mit LDH und SDS sind als S-Wert bei der Proteinkonzentration 3 mg/ml und der angegebenen SDS-Konzentration in 0,01 M Phosphatpuffer wiedergegeben, somit nur als "scheinbarer Sedimentationskoeffizient". Eine Extrapolation auf die Proteinkonzentration 0 und eine Umrechnung auf das Lösungsmittel Wasser zur Ermittlung der Sedimentationskonstanten $s_{20,w}^0$ waren für den Vergleich der einzelnen Versuchsergebnisse und mit Werten aus der Literatur nicht notwendig.

SDS-Konz. mM	SDS/LDH g/g	S
0	0	7,46 $\pm$ 0,13
2,14	0,2	6,76 $\pm$ 0,19
4,15	0,4	3,75 $\pm$ 0,09
$\ll$ 11,6	$\ll$ 1,4	a 3,84 $\pm$ 0,2 b 2,54 $\pm$ 0,47

Tabelle 2

Da diese Ergebnisse nur zur Orientierung dienten, wurde bisher von jedem angegebenen Konzentrationsverhältnis nur ein Versuchslauf vorgenommen. Wegen der verhältnismäßig geringen Proteinkonzentration wurden auf den Photos ziemlich abgerundete Peaks festgehalten; die Streubreite der Ergebnisse fiel entsprechend hoch aus.

Beim letzten Versuch war wegen der schlechten Lösungsfähigkeit die Konzentration an gelöstem SDS nicht genau zu definieren. Da das Verhältnis SDS: Protein etwa 1:1 betrug, erhielt man 2 Komponenten mit den angegebenen S-Werten. Der Überblick in Tabelle 2 zeigt jedoch deutlich, daß mit zunehmender Detergenzkonzentration die Proteinmoleküle langsamer als das native Enzym sedimentierten. Dies kann allein durch die zunehmende Viskosität der SDS-Lösung nicht erklärt werden. Folgende Zustandsänderungen des Makromoleküls kommen in Frage:

- die Teilchen lagerten sich zu Aggregaten zusammen mit zwar größerer Masse, aber auch höherem Reibungswiderstand;

- die Teilchen vergrößerten sich durch Entfaltung, woraus ein höherer Reibungswiderstand resultiert, oder
- sie dissoziierten in Untereinheiten mit kleineren Massen.

Auch eine Kombination der ersten oder letzten beiden Möglichkeiten wäre denkbar; nach den Ergebnissen der Chromatographie (siehe 3.6.2.) ist jedoch die erst genannte auszuschließen.

3.6. Gelchromatographie

3.6.1. Auftrennung der denaturierten LDH

Durch Gelchromatographie können Moleküle nach ihrer Größe aufgetrennt werden. Da nur die kleinen Moleküle in die vernetzten Makromoleküle des Gels diffundieren können, werden sie gegenüber den größeren, denen weniger Raum zur Verfügung steht, verzögert. So werden zunächst die großen und dann erst die kleinen Moleküle eluiert. Handelt es sich bei den getrennten Substanzen nur um globuläre Proteine, so erfolgt die Trennung nach dem Molekulargewicht. Liegt aber ein Gemisch von nativen und entfalteten Proteinen vor, so kann das Denaturierungsprodukt ebenfalls wegen des unterschiedlichen Volumens durch Gelfiltration abgetrennt werden. Da bei Aggregation oder bei Dissoziation erhebliche Größenunterschiede auftreten, lassen sich Aggregate und Untereinheiten von unveränderten Proteinmolekülen leicht trennen. Voraussetzung ist für einen Vergleich der Chromatographieläufe mit und ohne Dodecylsulfat, daß sich die Eigenschaften des Gels durch das Detergenz nicht verändern. Ein Beweis

dafür war die Konstanz des Ausschlußvolumens V_0 , das mit Blue-Dextran mit dem Molekulargewicht 2×10^6 bestimmt wurde. Da die SDS-Konzentration für die Chromatographie bis etwa 3 mM begrenzt war (siehe 3.1.), konnte das Konzentrationsverhältnis von Dodecylsulfat zu Enzym in Gramm pro Gramm nur dadurch erhöht werden, daß mit weniger LDH gearbeitet wurde.

In Abb. 8 sind die Elutionsdiagramme nativer und denaturierter LDH zum Vergleich übereinander dargestellt. Der bei Fraktion 42 auftretende Peak wird als M_4 bezeichnet in Anlehnung an das Isozym LDH-5 gleich LDH- M_4 , der bei Fraktion 51 als M_2 und derjenige bei Fraktion 60 als M_1 .

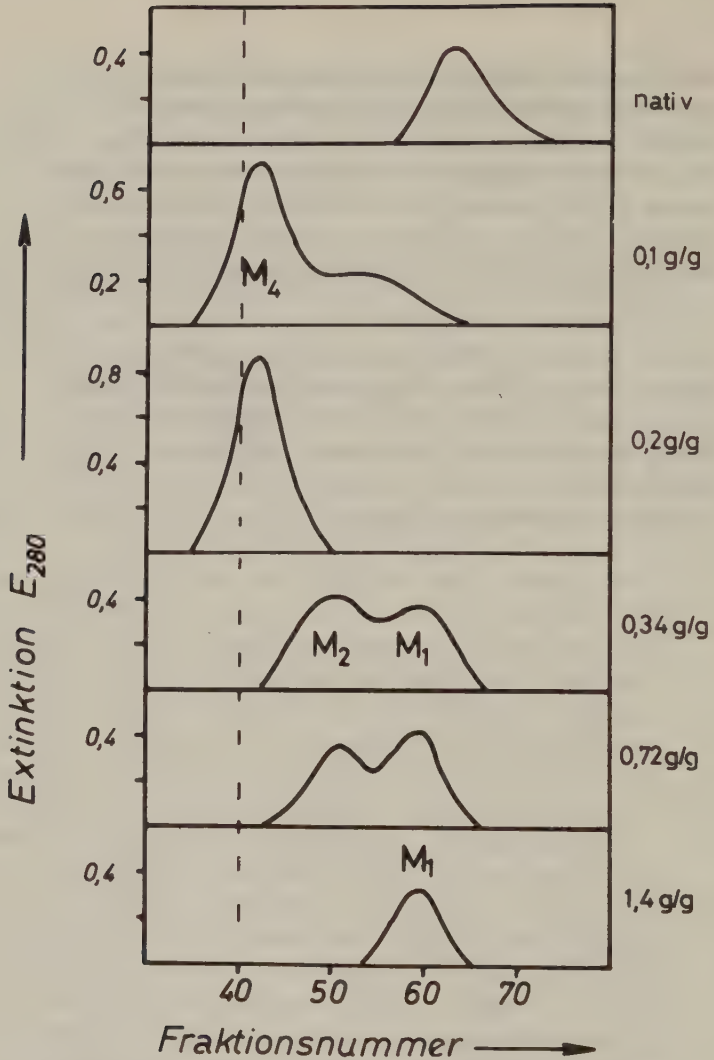


Abb.: 8 Elutionsdiagramme mit SDS denaturierter LDH.
Konzentrationsverhältnisse von oben nach unten
in g/g:

nat. LDH	(0,67 mg/ml)		
0,1	(1,35 "	0,5 mM SDS)	
0,2	(1,45 "	1 "	
0,34	(1,67 "	2 "	
0,72	(1,2 "	3 "	
1,4	(0,6 "	3 "	

Ausschlußvolumen V_0 bei Fraktion 40

Der erste Peak M_4 wurde in allen Versuchen deutlich nach dem Ausschlußvolumen V_0 eluiert, d.h. er liegt innerhalb des Trennbereichs der Chromatographiesäule (siehe auch 3.6.2.). Bei welchen SDS/LDH-Quotienten die einzelnen Peaks auftreten und in welcher relativen Höhe, zeigt die folgende Tabelle 1.

g/g	Peak
0,1	M_4 (+Übergang)
0,2	M_4
0,34	$M_2 > M_1$
0,65	$M_2 \approx M_1$
0,7	$M_2 < M_1$
1,4	M_1
1,6	M_1

Tabelle 1

- Bis zu einem Gramm-zu-Gramm-Verhältnis von 0,2 treten Moleküle einheitlicher Größe (M_4) auf, die gegenüber den nicht denaturierten stark vergrößert erscheinen.
- Von 0,3 bis mindestens 0,7 g/g liegt das Protein in zwei verschieden großen Bruchstücken (M_2 und M_1) vor, die jedoch beide größer als das native Enzym sind.
- Mit zunehmendem Quotienten nimmt der Peak M_2 an Größe ab, während M_1 zunimmt, bis
- mindestens ab 1,4 g/g nur noch eine einzige Molekülgröße (M_1) zu finden ist.

Bei dem in Abb. 8 gezeigten Elutionsdiagramm mit 0,1 g/g könnte es sich neben vollständig entfalteten Molekülen im Peak M_4 um ein Zwischenstadium zum nativen Zustand

von nicht vollständig entfalteten Teilchen handeln. Der Peak M_2 wurde allein nicht beobachtet.

Eine Inkubation des Proteins in Mercaptoäthanol, wie sie im allgemeinen angewandt wird, um S-S-Bindungen zu reduzieren und eine Rückoxidation der SH-Gruppen zu verhindern, brachte die gleichen Ergebnisse wie in Abb. 8. Obwohl Mercaptoäthanol beim Chromatographielauf vom Protein getrennt wurde, - es läßt sich durch seine Extinktion bei 280 nm in den Fraktionen 97-99 nachweisen - ,neigte LDH nicht zur Oxidation der durch SDS frei werdenden SH-Gruppen (siehe 3.4.) zu intermolekularen S-S-Brücken und damit zur Aggregation. In der Regel ist auch eine Elution von Proteinen in Dodecylsulfat mit Mercaptoäthanol nicht nötig, da SDS die SH-Gruppen gegeneinander schützt (14).

Eine Ausfällung des Enzymproteins trat bei 2 Versuchen auf: LDH wurde in SDS (0,4 bzw. 0,2 g/g) inkubiert, aber ohne SDS bzw. mit einer geringeren SDS-Konzentration als beim Inkubieren chromatographiert. Die Abtrennung des Detergenzes führte somit bereits bei einem Konzentrationsverhältnis von 0,2 g/g zu einer irreversiblen Denaturierung des Proteins.

3.6.2. Bestimmung des Molekulargewichtes

Eine genauere Beurteilung des in den Peaks M_4 , M_2 und M_1 auftretenden Enzyms brachte die Bestimmung seines Molekulargewichtes. Voraussetzung für eine Molekulargewichtsbestimmung durch Vergleich der räumlichen Ausdehnung (Gelchromatographie) mit der von Standardproteinen bekannten Molekulargewichts sind Dissoziation in Untereinheiten und gleiche Konformation, ohne Rücksicht auf ihre Zusammensetzung. Dann hängen die Ausmaße eines Proteinmoleküls nur von seinem Gewicht

ab. Diese Voraussetzung erfüllen reduzierte Proteine in SDS (1,4 g/g) besser als native. In SDS liegen Proteine in einem geordneten, stabähnlichen Zustand vor, nicht als "random coil" (Zufallsknäuel). Einfachstes Modell dafür ist ein verlängertes Ellipsoid, dessen kleinere Achse konstant und dessen größere linear proportional zum Molekulargewicht ist. Die Reduktion der S-S-Bindungen ist nötig, um eine maximale SDS-Bindung zu erreichen mit einer Vergrößerung des Stokes-Radius, von dem das Elutionsverhalten des Eichproteins abhängt (10,13,14,34).

Rinderserum- und Eialbumin (Molekulargewicht 45 000) wurden nach dem angegebenen Verfahren reduziert, hingegen Myoglobin (Molekulargewicht 17 000) nicht, da es keine S-S-Brücken besitzt. Die Neigung von Rinderserumalbumin (RSA) (Monomer, Molekulargewicht 67 000) zur Dimerisierung (Molekulargewicht 134 000) über intermolekulare Disulfidbrücken ist bekannt und wird verstärkt durch eine Entfaltung des RSA-Moleküls (12), wie sie auch durch SDS angenommen wird. Da die SH-Gruppen nicht, z.B. durch Alkylierung blockiert wurden und das Reduktionsmittel Mercaptoäthanol vom Serumalbumin getrennt wurde (siehe oben), war eine Dimerisierung durch Rückoxydation von SH-Gruppen zu S-S-Bindungen auch in Gegenwart von Dodecylsulfat möglich.

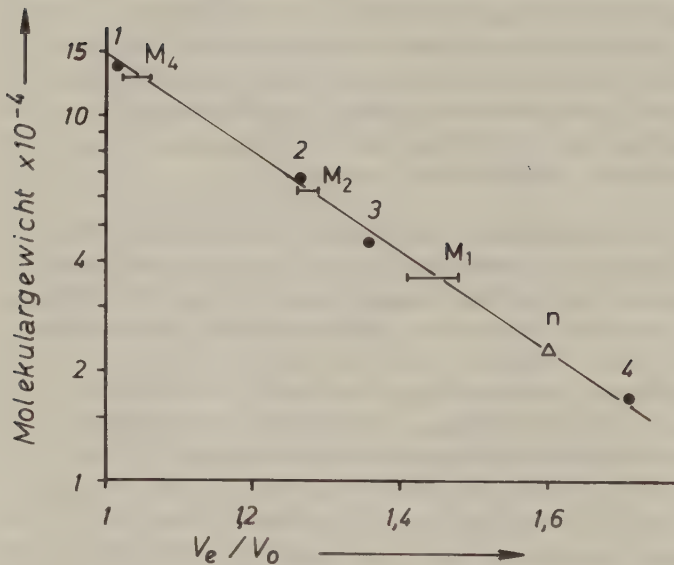


Abb.: 9 Molekulargewichtsbestimmung mit Sephadex G-200, SDS zu Eichproteinen 1,4 Gramm pro Gramm
 1) Rinderserumalbumin, dimer
 2) Rinderserumalbumin, monomer
 3) Eialbumin
 4) Myoglobin
 n) native LDH (siehe Text)

Die in Abb. 9 gezeigte Gerade wurde durch die Eichpunkte 1 - 4 gelegt. Für die Angaben der Peaks M_4 , M_2 und M_1 wurden die Mittelwerte der reduzierten Elutionsvolumina V_e/V_0 in die Eichkurve eingesetzt. Daraus läßt sich

- für M_4 ein Molekulargewicht von 130 000,
- für M_2 eines von 62 000 und
- für M_1 eines von 36 000 ablesen.

Die Ergebnisse früherer chromatographischer Molekulargewichtsbestimmungen nativer LDH reichen von 95 000 (46), 110 000 (50, 1969), 115 000 (1) bis 120 000 (51). Sie liegen beträchtlich unter dem nach Sedimentationsanalyse und anderen Methoden gefundenen Wert von 135 000 (52) und 142 000 (21) für das Tetramer. Der Grund dieser Differenz wird in der stark von einer Kugel abweichenden Form des LDH-Moleküls angenommen, die u.a. das Elutionsverhalten bestimmen (siehe 3.6.1.). Die hier berichtete Größe von 130 000 für das tetramere LDH-Molekül bei 0,2 g SDS/g Protein spricht dafür, daß seine Gestalt derjenigen eines stabförmigen Proteins sehr nahe kommt nach einer Denaturierung mit dem Detergenz. Dem Peak M_2 in Abb. 8 ist die dimere, M_1 die monomere Unter-einheit des Enzymmoleküls zuzuordnen. Die Abweichungen des Molekulargewichts des Tetramers und des Dimers gegenüber Literaturangaben (142 000 bzw. 72 000 (27,29)) lassen sich daraus erklären, daß eine der oben genannten Bedingungen für die chromatographische Molekulargewichtsbestimmung (Dissoziation) nicht erfüllt ist. Der Wert des Monomers (36 000, (20)) wird dagegen richtig getroffen, da bei 1,4 g SDS/g LDH das Enzym vollständig dissoziiert ist.

Aus einem Vergleich anhand des V_e/V_0 des Peaks M_4 (Abb.8) und des nativen Moleküls (n in Abb. 9) ergibt sich, daß sich die Molekülgrößen von nativem und entfaltetem Tetramer verhalten wie diejenigen eines Moleküls mit dem Molekulargewicht 23 000 zu einem mit 130 000. Wie aus Abb. 9 weiter zu ersehen ist, schneidet die Gerade durch die Eichpunkte die Ordinate etwa beim Molekular-

gewicht 150 000. Das bedeutet, daß eine Trennung von Proteinen mit der Chromatographie in SDS nur bis zu diesem Molekulargewicht möglich ist; größere Proteine werden im Ausschlußvolumen V_0 eluiert. Für das verwendete Gel Sephadex G-200 wird vom Hersteller (40) ein Fraktionierungsbereich für globuläre Proteine bis zum Molekulargewicht 800 000 angegeben. Legt man dem nativen LDH-Molekül das Molekulargewicht 130 000 zu Grunde, ergibt sich für die Vergrößerung durch SDS ein scheinbares Molekulargewicht von 735 000, was innerhalb des Trennbereichs von G-200 liegt. Zur Molekulargewichtsbestimmung, besonders nicht globulärer Proteine, wie z.B. Lactatdehydrogenase, stellt sich die Chromatographie mit Dodecylsulfat (1,4 g/g), - nach Reduktion bei S-S-Proteinen - als die Methode der Wahl heraus (siehe auch 14).

4. Diskussion

Aus den in den letzten Jahren (1969 - 71) veröffentlichten Arbeiten über Dodecylsulfat (13,14,30-36,43, 45) ergibt sich im wesentlichen folgendes Bild der SDS-Protein-Reaktion:

1. Das Bindungsverhältnis auf einer Gramm-zu-Gramm-Basis ist für alle Proteine identisch. Zwischen 5 und $8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ SDS gibt es einen gesättigten Komplex von $0,4 \text{ g SDS/g Protein}$, oberhalb von $8 \cdot 10^{-4} \text{ M}$ erhält man einen anderen Komplex von $1,4 \text{ g SDS/g Protein}$ (32,33).
2. Die SDS-Protein-Komplexe haben eine stäbchen-ähnliche Form, deren Länge nur vom Molekulargewicht des Proteins abhängt (14). Zu einer bedeutenden Entfaltung führen jedoch Detergentien nicht (41).
3. Bei maximaler Bindung dissoziieren mehrkettige Proteine in ihre Untereinheiten.

Zum Teil bestätigen die hier beschriebenen Untersuchungen dieses Bild, aber in einigen Punkten gibt es auch Abweichungen davon.

Fasst man die Ergebnisse der verschiedenen Untersuchungsmethoden für verschiedene Verhältnisse von SDS/LDH zusammen, so kann man die stufenweise Veränderung der LDH -Moleküle durch das Detergenz SDS verfolgen:
5

Bis zu einem Verhältnis von $0,05 \text{ g SDS/g LDH}$ lassen sich keine Denaturierungserscheinungen nachweisen. Die spezifische Aktivität (Abb. 1) und die Zahl der freien Sulfhydrylgruppen (Abb. 7) zeigen keine oder minimale Abweichungen vom nativen Zustand.

Versuche mit dem doppelten Verhältnis (0,1 g/g bringen bereits erhebliche Veränderungen, die sich zunächst in einem Verlust der enzymatischen Aktivität von etwa 30 % des ursprünglichen Wertes zeigen. Damit einher geht die Zunahme der titrierbaren SH-Gruppen auf etwa 7. Auch durch die Gelfiltration läßt sich die Konformationsänderung erkennen. Unter den beschriebenen Bedingungen wird die LDH nicht mehr in ihrer ursprünglichen Position eluiert, sondern sie durchwandert die Säule viel schneller als die native LDH, da die Enzymmoleküle durch Entfaltung vergrößert sind. Die Vergrößerung durch Aggregation kann auf Grund der Untersuchungen mit der Ultrazentrifuge ausgeschlossen werden. Bei dem Gewichtsverhältnis von 0,1 g SDS/g LDH trat ein Teil der Moleküle im Peak M_4 (Abb. 8) auf, während sich der Rest zwischen der nativen und der dem Peak M_4 entsprechenden Molekülgröße verteilte. Dies legt den Schluß nahe, daß die Entfaltung durch SDS nicht in gleicher Weise alle Proteinmoleküle erfaßt, sondern möglichst ein Teil sich maximal entfaltet, die übrigen Moleküle aber in verschiedenem Ausmaß unvollständig entfaltet bleiben.

Sobald im Chromatogramm (Abb. 8) nur noch der Peak M_4 bei 0,2 g SDS/g LDH auftritt, lassen sich auch alle SH-Gruppen des Enzyms (18) nachweisen, die sonst im Inneren des Moleküls verborgen sind. Eine entsprechende Zunahme von SH-Gruppen mit SDS ist von anderen Proteinen her bekannt (16,22,23); auch Phosphorylase b, das wie LDH keine Disulfidbrücken besitzt, gab mit (umgerechnet) 0,25 g/g die gleiche Anzahl Sulfhydrylgruppen frei wie mit höheren SDS-Konzentrationen (22). Der Autor erklärt dieses mit der sterischen Behinderung des Nachweisreagenzes durch proteingebundenes SDS. Eine in dem beschriebenen Konzentrationsbereich

erfolgte vollständige Entfaltung der Phosphorylase b wäre jedoch eine näher liegende Deutung. Wie mit LDH-5 (vergl. Abb. 7) wären bei 0,25 g/g alle vorhandenen SH-Gruppen zugänglich. An LDH-1 waren alle 27 Sulhydrylgruppen nachweisbar nach einer Denaturierung mit dem (einzigen verwendeten) Verhältnis von 0,5 g SDS/g Protein, im nativen Zustand nur 4 (38).

Harnstoff bewirkt in hoher Konzentration eine expansive Entfaltung eines Proteinmoleküls, jedoch keine Dissoziation (18); nach diesem Verfahren (8M Harnstoff) wurden mit LDH-5 18,4 Sulhydrylgruppen gefunden (umgerechnet auf die hier angegebenen Parameter (siehe 2.2.4.) (3). Die Dissoziation des Tetramers (siehe unten) führt zu keiner weiteren Erhöhung freier SH-Gruppen. Ähnlich wie die Denaturierung mit Harnstoff bewirkt auch ein niedriger pH-Wert eine Konformationsänderung in Richtung auf eine Entfaltung. Mit beiden Methoden zeigte das Differenzspektrum von LDH ein Minimum bei etwa 296 nm (25), wie auch nach SDS-Behandlung (Abb. 3). Die Sedimentationsgeschwindigkeit von LDH-1 verringert sich in 6 M Harnstoff entsprechend der molekularen Ausdehnung von 6,93 auf 5,34 S (18). Von 7,46 der nativen LDH-5 geht der S-Wert mit SDS bei 0,2 g/g sogar nur auf 6,76 zurück (Tabelle 2, näheres siehe 3.5.). Dieser Vergleich unterstreicht, daß das LDH-Molekül in dem genannten Verhältnis zu SDS nur vergrößert, aber noch nicht in kleinere Untereinheiten aufgetrennt ist. Das Innere des Moleküls und sein Volumen sind jedoch durch die Denaturierung wesentlich beeinflusst im Sinne einer Auffaltung des Tetramers, um mehr als das Fünffache seiner nativen Größe (Abb. 9). Eine Aggregatbildung von Mono-, Di- oder Terameren über Disulfidbrücken nach der SDS-Denaturierung konnte an LDH-5 ausgeschlossen werden.

Wie man aus dem Verlauf der Aktivitätskurve (Abb. 1) schließen kann, erfolgt die Bindung des SDS primär nicht an die 4 aktiven Zentren des Moleküls. Beim Konzentrationsverhältnis 0,05 g SDS/g LDH treffen in der Lösung bereits 25 Detergenzmoleküle auf 1 Enzymmolekül, die jedoch trotz starker Bindungskräfte (41) ohne Einfluß bleiben. Erst die zunehmende Entfaltung inaktiviert das Enzym, wobei auch dem voll-entfalteten Tetramer noch enzymatische Eigenschaften zukommen. Einen ähnlichen S-förmigen Verlauf der Restaktivität fand man bei Glutamatdehydrogenase (35); aus Lineweaver-Burk-Diagrammen interpretiert der Autor die Enzymhemmung durch SDS im niedrigen Konzentrationsbereich als unkompetitiv, wie es auch von Methämoglobin (36) beschrieben wird. Obwohl es sich dabei um andere Enzymproteine und Substrate handelte, wäre diese Vorstellung auch für LDH denkbar; aus Abb. 1 allein ist eine Aussage dazu nicht möglich.

Eine Erhöhung des Konzentrationsverhältnisses von SDS zu LDH über 0,2 g/g dissoziiert das Enzymmolekül in Dimere und Monomere, über 1,4 g/g nur noch in monomere Untereinheiten (Abb. 8 und 9). Selbst letztere sind durch zusätzliche Entfaltung noch größer als das native tetramere Molekül. Dies widerspricht den Angaben über LDH-1 (H4), das auch in kleinere Partikel aufgespalten sein soll (s. unten); eine erhebliche Auffaltung der Untereinheiten wird jedoch verneint (38).

Einen weiteren Beweis für das Auftreten von Monomeren bei hohem SDS/LDH-Verhältnis erbrachte die Sedimentationsanalyse (Tab. 2, Wert b S = 2,54). Von LDH-1 wird bei einem Konzentrationsverhältnis von 1,0 bis 1,2 gSDS/g Protein ein S-Wert von 2,5 bis 2,9 berichtet (38). Auch zwei weitere Enzyme, Aldolase und Alkoholdehydrogenase, führten zu entsprechenden Er-

gebnissen (30). Ein Vergleich der beiden Proteine mit LDH zeigt die große Ähnlichkeit: Molekulargewicht 160 000 bzw. 150 000, 4 Untereinheiten, S-Werte der nativen Enzyme 7,9 bzw. 7,8 (LDH: M.G.: 140 000; S = 7,46). Aldolase ergab bei 1,7 g SDS/g Enzym ein $s_{25,s}$ von 2,6, Alkoholdehydrogenase bei 1,3 g/g einen S-Wert von 2,3. In allen drei Fällen werden die genannten Werte zu Einzelkettenproteinen, d.h. zu Untereinheiten in Beziehung gesetzt.

In der Chromatographie wurde das Dimer allein (Molekulargewicht 62 000, Abb.9) nicht beobachtet, was in der Literatur z.T. bestätigt wird (20), aber auch bereits als die kleinste Untereinheit (Monomer) angesehen wird (27).

Die Ergebnisse der durchaus verschiedenen Untersuchungsmethoden dieser Arbeit lassen sich miteinander vereinbaren, legt man nur jeweils das gleiche Konzentrationsverhältnis von Detergenz zu Protein in Gramm pro Gramm zu Grunde. Bei um den Faktor 2 verschiedenen absoluten Konzentrationen ergab das gleiche Verhältnis g SDS/g LDH die gleiche relative Extinktionsänderung (Abb. 5). Aus Angaben von Sedimentationsanalysen mit wechselnden Konzentrationen von SDS und LDH-1 (38) kann man auch - im Gegensatz zum Autor - ersehen, daß die Sedimentationsänderung nur vom Konzentrationsverhältnis abhängig ist, soweit sich die Versuchsbedingungen vergleichen lassen. Das Ausmaß einer Reaktion zwischen SDS und Protein läßt sich nicht an der absoluten Konzentration des SDS (z.B. in M) festlegen, sondern nur am Bindungsverhältnis, im Falle der Lactatdehydrogenase-5 aber an dem leichter bestimmbareren Konzentrationsverhältnis (siehe auch 5, 1956). Dieses stimmt bei der Dissoziation in Monomere (bei 1,4 g/g), der weitesten beobachteten Reaktion zwischen LDH und SDS an Protein (32, 33) überein.

Aus den bisher bekannten Modellvorstellungen über die Wirkung von Dodecylsulfat auf Proteine lassen sich auch Schlüsse über die Bindungskräfte am LDH-Molekül ziehen. Die Faltung eines Proteins stabilisieren neben anderen Mechanismen hydrophobe Wechselwirkungen nichtpolarer Seitenketten. Dabei dürfte es sich um intramolekulare Micellen handeln, analog denen von Detergenzien in wäßriger Lösung (24). Ebenso wird die Bildung von Micellen zwischen der hydrophoben, aliphatischen Kette des SDS und hydrophoben Proteinseitenketten diskutiert (41,32). Die Abnahme der hydrophoben Wechselwirkungen innerhalb des Proteinmoleküls durch SDS unterbricht seine Struktur (35), seine Faltung, und ergibt definitionsgemäß eine Denaturierung ("Konformationsänderung"). Die maximale Bindung von SDS an Protein, die nur eine Funktion seines Peptidanteils ist (Vergleich mit Glykoproteinen, 32), hängt nicht von der Ionenstärke der umgebenden Lösung ab; sie ist somit nicht elektrostatisch bedingt (33). Sie wird auch beschränkt durch Disulfidbrücken, die das Protein an einer weiteren Entfaltung hindern (13,32). Versuche mit der Elektrophorese ergaben, daß durch die SDS-Anionen alle Proteinmoleküle einheitlich negativ geladen werden (43). Die Erklärung läßt sich aus dem oben beschriebenen ableiten: Die hydrophilen Anteile des gebundenen Detergenzes, die ionisierten Sulfatgruppen ($-\text{SO}_4^{--}$), sind, von der Peptidkette nach außen gewandt, dem Lösungsmittel ausgesetzt.

Die Entfaltung und die Dissoziation der LDH-5 treten nicht gleichzeitig, sondern getrennt nacheinander, bei steigendem Verhältnis SDS/LDH, in Erscheinung. Dies läßt sich auf die verschiedenen Bindungskräfte zurückführen, die die Tertiär- und Quartärstruktur des Enzymmoleküls bestimmen. Hohe Ionenstärke einer LDH-Lösung führt zur Dissoziation bis zum Monomeren. Im

Gegensatz zur Faltung der einzelnen Polypeptidketten werden daher die Untereinheiten im wesentlichen durch elektrostatische Wechselwirkungen heteropolarer Ionenpaarbindungen zum Tetramer zusammen gehalten (4,20,21,29). Die Dissoziation in der LDH tritt auch ein, sobald die durch das SDS bedingten negativen Ladungen der Untereinheiten deutlich überwiegen und zur elektrostatischen Abstoßung führen.

Mit der Gelchromatographie (Abb. 8) konnten weder Trimere dargestellt werden, noch allein Dimere. Es erscheinen entweder Dimere in Verbindung mit Monomeren oder bei hohem SDS/LDH-Verhältnis nur noch Monomere. Nach der relativ kleinen Konzentrationszunahme von 0,2 auf 0,34 g/g sind keine Tetramere mehr nachzuweisen. Die Dissoziation einer Untereinheit aus dem Tetramerkomplex könnte einen asymmetrischen, unstabilen Zustand herbeiführen, der die weitere Trennung einer Monomers nach sich zieht. "Stäbchenähnlich" (14), ziemlich gestreckt müßten die einzelnen Proteinketten erscheinen infolge der negativen Ladungen an ihrer Außenseite und deren gegenseitige Abstoßung.

Die hier vorgelegten Versuchsergebnisse zeigen entsprechend den Angaben in der Literatur, daß das Gramm-zu-Gramm-Verhältnis SDS/Protein bestimmend für den Denaturierungszustand des Proteins ist und nicht etwa die Molarität der SDS-Lösung.

Bei Einwirkung von 1,4 g SDS pro Gramm LDH wurde ebenfalls die vollkommene Dissoziation in die Untereinheiten erhalten. Bei niedrigerem SDS/Protein-Verhältnis wurde allerdings im Gegensatz zu den früheren Arbeiten eine weitgehende Entfaltung beobachtet, die sich in der gesteigerten Reaktionsfähigkeit der SH-Gruppen und der Vergrößerung des Enzymmoleküls zeigt.

Die in dieser Arbeit erhaltenen Chromatographie-
ergebnisse ergeben einige neue Gesichtspunkte für
die Deutung der Gelchromatographie von strahleninakti-
vierter LDH, die in der Einleitung erwähnt wurde.
Ein Teil der Bestrahlungsprodukte der LDH wurde im-
mer im Ausschlußvolumen eluiert, d.h., daß diese
Produkte größer als die durch SDS völlig entfalteten
LDH-Moleküle sind, die innerhalb des Trennbereichs
von G-200 gefunden wurden. Da außerdem bei diesen Be-
strahlungsprodukten nur 3 reaktionsfähige SH-Gruppen
nachgewiesen werden konnten, ist die Entfaltung der
Moleküle verglichen mit der durch SDS bedingten sehr
gering. Man kann also auf Grund dieser Versuchsergeb-
nisse sagen, daß die Vergrößerung der bestrahlten
Moleküle nur durch Aggregation bedingt sein kann.

Diese Arbeit eröffnet auch die Möglichkeit zu weite-
ren Untersuchungen an bestrahlter LDH. So ließe sich
aus Vergleichen der Chromatogramme mit und ohne SDS
die durch Bestrahlung bedingte Entfaltung der LDH ab-
schätzen. Besonders interessant wird die Anwendung
von SDS auf die strahleninduzierten Aggregate sein,
da man hierdurch Aufschluß über die Art ihrer Bin-
dung erhalten kann.

5. Zusammenfassung

Lactatdehydrogenase-5 wurde mit Natriumdodecylsulfat in steigendem Konzentrationsverhältnis Gramm SDS/Gramm Protein behandelt. Die relative Inaktivierung des Enzyms durch Denaturierung war bei allen untersuchten Verhältnissen nach 2 Minuten eingetreten, die Differenz der Extinktionen nativer und denaturierter LDH bei 296 nm bereits nach 5 Sekunden. Die Veränderung des LDH-Moleküls durch SDS ließ sich in Abhängigkeit des Konzentrationsverhältnisses stufenweise verfolgen. Bis 0,2 g/g nahm die Zahl der freien SH-Gruppen zu, im Chromatogramm trat ein Peak innerhalb des Trennbereichs vor dem nativen Protein auf. Dies spricht für eine expansive Entfaltung des Tetramers durch SDS, und zwar um mehr als das Fünffache seiner nativen Größe. Mit höherem g/g-Quotienten trat eine Dissoziation in Di- und Monomere auf, die beide noch größer als das native Tetramer waren. Über 1,4 g/g konnten nur noch monomere Untereinheiten nachgewiesen werden. Eine Molekulargewichtsbestimmung in SDS ergab für das Tetramer ein Gewicht von 130 000, für das Dimere 62 000 und für das Monomere 36 000. Ein Vergleich mit den Bestrahlungsprodukten von LDH-5 führt zu dem Schluß, daß es sich dabei nur um Aggregate von Tetrameren und Bruchstücken handeln kann, nicht um erheblich aufgefaltete Moleküle.

6. Literatur

1. DENKL, C.P. : Doktorarbeit, Erlangen (1971)
2. KUNIGK, K. : Doktorarbeit, Erlangen (1973)
3. MÜLLER, E. : Doktorarbeit, Erlangen (1973)
4. ADAMS et al. : Nature 227, 1098 (1970)
5. BRAND, B.P.,
P. JOHNSON : Transactions of the Faraday
Soc. 52, 438 (1956)
6. BRAND, L.,
J. EVERSE,
N.O. KAPLAN : Biochemistry 1, 423 (1962)
7. BERGMAYER, H.U. : Methoden der enzymatischen Ana-
lyse, Bd I, Weinheim/Bergstr.,
Verlag Chemie (1970)
8. DUNKER, A.K.,
R.R. RUECKERT : J. Biol. Chem. 244, 5074 (1969)
9. DONOVAN, J.W.,
M. LASKOWSKI,
H. SCHERAGA : J. Am. Chem. Soc. 83, 2686 (1961)
10. DETERMANN, H. : Gelchromatographie, Berlin-
Heidelberg-New York, Springer-
Verlag (1967)
11. EDELHOCH, H.,
R.E. LIPPOLDT : J. Biol. Chem. 235, 1335 (1960)
12. FORSTER, J.F.
in: PUTNAM : "The Plasma Proteins", Bd. I,
Academic Press (1960)
13. FISH, W.W.,
K.G. MANN,
C. TANFORD : J. Biol. Chem. 244, 4989 (1969)
14. FISH, W.W.,
J.A. REYNOLDS,
C. TANFORD : J. Biol. Chem. 245, 5166 (1970)
15. FISCHER, L. : An Introduction to Gelchromato-
graphy, Amsterdam-London, North-
Holland Publishing Company (1969)
16. HABEEB, A.F.S.A. : Biochim. Biophys. Acta 115,
440 (1966)
17. HUMPHREY, R.E.,
WARD, HINZE : Analytical Chemistry 42, 698
(1970)

18. JAENICKE, R.,
G. PFLEIDERER : Biochim. Biophys. Acta 60,
615 (1962)
19. JAENICKE, R.,
D. SCHMID,
S. KNOF : Biochemistry 7, 919 (1968)
20. JAENICKE, R. in : "Pyridine Nucleotide Dependent
Dehydrogenases", Berlin-Heidel-
berg-New York, Springer-Verlag
(1970)
21. JAENICKE, R.,
S. KNOF : European J. Biochem. 4, 157 (1968)
22. KLEPPE, K.,
S. DAMJANOVICH : Biochim. Biophys. Acta 185, 88
(1969)
23. KEMP, G.,
P.B. FOREST : Biochemistry 7, 2596 (1968)
24. KAUZMANN, W. : Advances in Protein Chem. 14,1
(1959)
25. LIBOR, S.,
P. ELÖDI, Z. NAGY : Biochim. Biophys. Acta 110, 484
(1965)
26. MARKERT, C.L. : Ann. N.Y. Acad. Sc., 151, 14
(1968)
27. MILLAR, D.B.S. : J. Biol. Chem. 237, 2135 (1962)
28. MIRE, M. : Biochim. Biophys. Acta 181, 35
(1969)
29. MARKERT, C.I.,
E.I. MASSARO : Science 162, 695 (1968)
30. NELSON, C.A. : J. Biol. Chem. 246, 3895 (1971)
31. PAGE, M.,
C. GODIN : Canadian J. Biochem. Physiol. 47,
401 (1969)
32. PITT-RIVERS, R.,
F.S.A. IMPIOMBATO : Biochem. J. 109, 825 (1968)
33. REYNOLDS, J.A.,
C. TANFORD : Proceedings of the National Aca-
demy of Sciences 66, 1002 (1970)
34. REYNOLDS, J.A.,
C. TANFORD : J. Biol. Chem. 245, 5161 (1970)
35. ROGERS, K.S.,
S.C. YUSKO : J. Biol. Chem. 244, 6690 (1969)
36. ROGERS, K.S. : Enzymologia 32, 96 (1970)

37. DI SABATO, G.,
A. PESCE,
N.O. KAPLAN : Biochim. Biophys. Acta 77,
135 (1963)
38. DI SABATO, G.,
N.O. KAPLAN : J. Biol. Chem. 239, 438 (1964)
39. SCHERAGA, H.A. in: "Protein Structure", New York,
London, Academic Press (1961)
40. Informationsschrift "Sephadex-Gelfiltration", Aufl. 1969
41. TANFORD, C. : Advances of Protein Chemistry 23,
121 (1968)
42. WHITAKER, J.R. : Analytical Chemistry 35, 1950
(1963)
43. WEBER, K.,
M. OSBORN : J. Biol. Chem. 244, 4406 (1969)
44. WETLAUFER, D.B. : Advances of Protein Chemistry
17, 303 (1961)
45. WEBER, K.,
D.J. KUTER : J. Biol. Chem. 246, 4504 (1971)
46. ZINKHAM, W.H.,
N.A. HOLTZMANN,
H. ISENSEE : Biochim. Biophys. Acta 160,
172 (1968)
47. ELLMANN, G.L. : Arch. Biochem. Biophys. 82, 70
(1959)
48. ANDREWS, P. : Biochem. J. 91, 222 (1964)
49. PFLEIDERER, G.,
D. JECKEL : European J. Biochem. 2, 171
(1967)
50. DETERMANN, H.,
U. MÄTTNER : FEBS Letters 3, (1969)
51. WIELAND, Th.,
P. DUESBERG,
H. DETERMANN : Biochem. Z., 337, 303 (1963)
52. MARKERT, C.L. : Science 140, 1329 (1963)
53. BARNETT, W.,
S.P. SPRAGG : Nature New Biology 234, 191
(1971)

Herrn Prof. Dr. Dr. H. Pauly danke ich für die Überlassung des Themas, die großzügige materielle Unterstützung und die vorbildlichen Arbeitsmöglichkeiten am Institut für Physikalische und Medizinische Strahlenkunde.

Frau Dr. H. Schübler bin ich besonders dankbar für ihre wissenschaftliche Anleitung, ihre praktische Unterstützung und ihren persönlichen Einsatz für diese Arbeit.

Lebenslauf

Am 16. Februar 1948 wurde ich, Hans-Michael Eichhorn, in München als einziger Sohn meiner Eltern, des Polizeidirektors Heinrich Eichhorn und seiner Ehefrau Senta Erika, geb. Rapelius, geboren.

Bis 1954 lebte ich in München, danach in Bayreuth, wo ich von 1954 bis 1958 die Volksschule besuchte. Im gleichen Jahr trat ich in das humanistische Gymnasium Christian-Ernestinum in Bayreuth ein. 1967 legte ich dort das Abitur ab.

An der Universität Erlangen-Nürnberg begann ich im Wintersemester 1967/68 das Studium der Medizin; im Sommer 1973 schloß ich es mit dem Staatsexamen ab.

Offsetdruck-Fotodruck

J. Hogl, 8520 Erlangen, Hauptstr. 109 (Nähe Martin-Luther-Platz) Tel. 22990
